

Rec'd PCT/PTO 25 FEB 2005

525564

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 3 月 11 日 (11.03.2004)

PCT

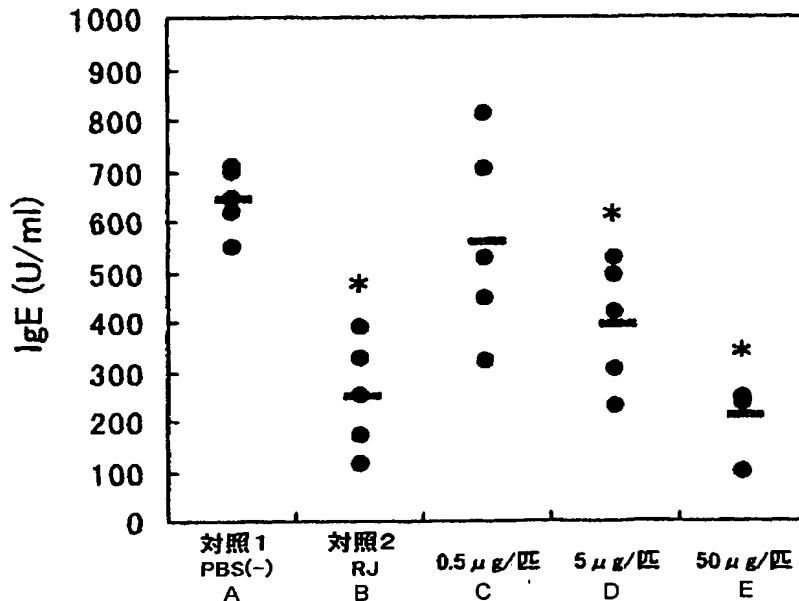
(10) 国際公開番号  
WO 2004/019971 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/17, (72) 発明者; および  
A61P 37/08, A61K 7/00, 7/48, 35/64 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡本 岩夫 (OKAMOTO, Iwao) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 新井 紀恵 (ARAI, Norie) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 河野 恵三 (KOHNO, Kelzo) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 栗本 雅司 (KURIMOTO, Masashi) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 佐能 吏 (SANO, Osamu) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県 岡山市 下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010795
- (22) 国際出願日: 2003 年 8 月 26 日 (26.08.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-252087 2002 年 8 月 29 日 (29.08.2002) JP  
特願2003-22776 2003 年 1 月 30 日 (30.01.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 林原 健 (HAYASHIBARA, Ken) [JP/JP]; 〒700-0921 岡山県 岡山市 東古松 4 丁目 9 番 8 号 Okayama (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, JP, KR, US.

[続葉有]

(54) Title: ANTIALLERGIC AGENT

(54) 発明の名称: 抗アレルギー剤



A...CONTROL 1 PBS(-)  
B...CONTROL 2 RJ  
C...0.5 μg/ANIMAL  
D...5 μg/ANIMAL  
E...50 μg/ANIMAL

(57) Abstract: It is intended to provide an antiallergic agent which efficaciously relieves symptoms accompanying an allergic disease without causing any serious side effect. This object is achieved by providing an antiallergic agent which contains, as the active ingredient, proteins collected from royal jelly or refined royal jelly, or royal jelly or refined royal jelly containing the same.

(57) 要約: 重篤な副作用を惹起することなくアレルギー疾患に伴う諸症状を効果的に緩和する抗アレルギー剤を提供することを課題とし、有効成分として、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーから採取される蛋白質、又はそれらを含むローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤を提供することにより解決する。

WO 2004/019971 A1



(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

## 明 細 書

## 抗アレルギー剤

## 5 技術分野

本発明は、抗アレルギー剤に関するものであり、より詳細には、有効成分として、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーから採取される蛋白質、又は、それら蛋白質を含有するローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤に関するものである。

10

## 背景技術

近年、食生活などの変化に伴って、アレルギー性疾患の罹患者が増加しており、とりわけ、花粉症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、接触過敏症などアトピー性疾患の罹患者の増加が問題となっている。従来、アレルギー疾患の治療においては、抗ヒスタミン剤やステロイド剤などの薬剤が対症療法的に投与されているけれども、これらの薬剤は長期連用による副作用が大きいという問題があった。このような状況に鑑み、アレルギー疾患における諸症状を効果的に緩和することができ、かつ、日常生活に支障をきたすことなく、長期連用し得る治療手段が望まれていた。

20

一方、最近、ローヤルゼリーに様々な生理活性のあることが認められ、健康食品としての関心が高まっている。ローヤルゼリーは、周知のとおり、ミツバチの巣における王台（女王バチの房）に蓄積された、働きバチの外分泌腺からの乳白色の分泌物であり、女王バチとなるべき幼虫に与えられる餌であると言われている。ローヤルゼリーの化学的組成は生産地や季節などにより、多少の差違はあるものの、水分65～75%、

25

蛋白質 15 ~ 20 %、炭水化物 10 ~ 15 %、脂肪 1.7 ~ 6 %、灰分  
0.7 ~ 2 % 含むとされている。ジェイ・シュミットゾーバ (J. S c  
h i m i t z o v a) 等は、ローヤルゼリーに含有する 5 種類の主要な  
蛋白質の cDNA を、ミツバチ (*A p i s m e l l i f e r a*) より  
5 クローン化に成功し、それらの塩基配列及びそれらから推定されるアミ  
ノ酸配列を明らかにして、これら蛋白質を MRJP1、MRJP2、M  
RJP3、MRJP4、及び MRJP5 (MRJP : ma j o r ro  
y a l je l l y pr o t e i n) とそれぞれ命名している。しか  
しながら、これら蛋白質の生理活性に関しては何ら研究がなされてい  
10 い。

斯かる状況に鑑み、本発明の課題は、諸種のアレルギー疾患へ適用す  
ると、重篤な副作用を惹起することなく、アレルギー疾患に伴う諸症状  
を効果的に緩和する手段を提供することを課題とするものである。

## 15 発明の開示

上記の課題を解決する目的で、本発明者がローヤルゼリーに着目し、  
鋭意研究したところ、ローヤルゼリーに含まれる低分子又は高分子のあ  
る種の成分、具体的には例えば、配列表における配列番号 1 又は 2 のい  
ずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質が、生体内において  
20 は、抗体及び／又はサイトカインの産生を著明に抑制することが判明し、  
重篤な副作用を惹起することなくアレルギー疾患に伴う諸症状を効果的  
に緩和することを確認した。

即ち、本発明は、有効成分として、ローヤルゼリー又は精製ローヤル  
ゼリーから採取される蛋白質、又は、それら蛋白質を含有するローヤル  
25 ゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤を提供する  
ことによって、上記の課題を解決するものである。

さらに、本発明は、上記の抗アレルギー剤を含んでなる飲食物を提供することによって、上記の課題を解決するものである。

さらに、本発明は、上記の抗アレルギー剤を含んでなる化粧品を提供することによって、上記の課題を解決するものである。

5 さらに、本発明は、上記の抗アレルギー剤を含んでなる医薬品を提供することによって、上記の課題を解決するものである。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、生ローヤルゼリーに含まれる本発明の抗アレルギー蛋白質  
10 の2次元電気泳動パターンを示すものである。

第2図は、ローヤルゼリーの水溶性画分を、DEAE-5PWゲルを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した際の活性蛋白質の溶出を示すクロマトグラムである。

(○：相対IL-2産生率、●：相対IL-4産生率、△：相対細胞増  
15 殖率、1：活性蛋白質1溶出フラクション、2：活性蛋白質2溶出フラクション)

第3図は、活性蛋白質1画分を、ヘパリン(Heparin)-5PWゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供した際の活性蛋白質の溶出を示すクロマトグラムである。

20 (○：相対IL-2産生率、●：相対IL-4産生率、△：相対細胞増殖率、1：活性蛋白質1-1溶出フラクション、2：活性蛋白質1-2溶出フラクション)

第4図は、ローヤルゼリー又はRJP70をOVA/Alumで免疫した雌性BALB/cマウスに腹腔内投与した際の、血清中の抗OVA  
25 -IgE抗体価を測定した結果を示す図である。

(●：各個体(5匹)のデータ、-：平均値、\*：危険率5%以下で有

意差を示すデータ)

第5図は、ローヤルゼリー又はRJP70をOVA/Albumで免疫した雌性BALB/cマウスに腹腔内投与した際の、血清中の抗OVA-IgG1抗体価を測定した結果を示す図である。

5 (● 各個体(5匹)のデータ、-:平均値、\*:危険率5%以下で有意差を示すデータ)

発明を実施するための最良の形態

10 本発明は、有効成分として、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーから採取される蛋白質、又は、それら蛋白質を含有するローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤に関するものである。本発明に用いるローヤルゼリーとしては、それを分泌するミツバチの種類としては、セイヨウミツバチ(*Apis mellifera*)、トウヨウミツバチ(*Apis cerana*)、オオミツバチ(*Apis dorsata*)、コミツバチ(*Apis florea*)などが、また、  
15 その産地としては、日本、南米、北米、豪州、中国、欧州などが挙げられる。これらのローヤルゼリーは、それが、抗アレルギー作用を有する低分子又は高分子の成分、例えば、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質を含有し、未加工  
20 のままか、あるいは適宜の精製工程で処理した上で、ヒトをはじめとする哺乳類に適用したときに、アトピー性アレルギー、組織特異性アレルギー、免疫複合体型アレルギー、遅延型アレルギーなどのアレルギー性疾患の治療、予防に効果を発揮するものである限り、形態、純度、調製方法にかかわらず、有利に用いることができる。

25 抗アレルギー剤の用途にもよるけれども、ローヤルゼリーの抗アレルギー作用が弱い場合には、低分子又は高分子の生理活性物質を精製する

ための方法を適用して精製する。本発明でいう精製ローヤルゼリーとは、生ローヤルゼリーに含まれる成分の一部を精製により部分的に除き、且つ、着目する成分の固形物当たりの含有量を高めたものを意味し、本発明においては、ローヤルゼリー水溶性蛋白質画分が好ましく用いられる。

5 個々の精製方法としては、例えば、濾過、濃縮、乾燥、遠心分離、分別沈澱、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などが挙げられ、必要  
10 に応じて、これらは組み合わせて適用される。

本発明で用いるローヤルゼリーにおける抗アレルギー成分の具体例としては、例えば、配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質が挙げられる。本発明でいう蛋白質とは、それが配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部  
15 分アミノ酸配列を有し、且つ、生体内において抗アレルギー作用を発揮するものであるかぎり、その純度、由来、調製方法は問わない。好ましい蛋白質としては、例えば、配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質が挙げられ、その蛋白質は、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ( S D S - P A G E ) に  
20 よる分子量が 55,000 乃至 70,000 ダルトンであって、生物作用として抗体及び／又はサイトカインの産生を抑制するという作用を有している。より好ましい蛋白質としては、例えば配列表における配列番号 3 又は 4 に示すアミノ酸配列を有するものが挙げられ、斯かるアミノ酸配列を有する蛋白質はいずれも生体において抗体及びサイトカイン産  
25 生抑制が顕著であり、しかも長期連用しても重篤な副作用を惹起することなく、アレルギー疾患に伴う諸症状を効果的に緩和するので、この発

明において極めて有用である。なお、これらの蛋白質は単なる例であって、本発明でいう蛋白質は決してこれらに限定されてはならず、例えば、抗アレルギー作用を実質的に失わない範囲で配列表における配列番号 3 又は 4 のいずれかの全アミノ酸配列において、これらアミノ酸配列におけるアミノ酸の 1 個又は 2 個以上が欠失、又は他のアミノ酸で置換されるか、あるいは、配列番号 3 又は配列番号 4 のアミノ酸配列に、他のアミノ酸が 1 個又は 2 個以上挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するものであってもよいことは言うまでもない。

本発明に用いる配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する抗アレルギー蛋白質は、本来、ローヤルゼリーに含有される蛋白質であり、通常、天然のローヤルゼリーから採取することにより得ることができる。本発明で用いられる抗アレルギー蛋白質は、原料としてのローヤルゼリーから、前記の精製方法の 1 又は複数を適宜用いて、所望のレベルにまで精製して得ることができる。本発明でいう単離若しくは部分精製された配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質とは、このような各種精製方法を用いて完全に精製・単離されたもの若しくは部分的に精製されたものを意味し、いずれも本発明に有利に用いることができる。

本発明の抗アレルギー剤の有効成分である、配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質は、通常、電気泳動により分子量を測定するなどして識別・定量することができる。電気泳動の方法としては、通常、還元剤存在下での SDS-PAGE 法、等電点電気泳動法又はこれらを組み合わせた 2 次元電気泳動が用いられる。第 1 図は、ローヤルゼリーの 2 次元電気泳動による抗アレルギー蛋白質の検出結果を示す。ローヤルゼリー中に存在する配列表における配列番号 1 の部分アミノ酸配列を有する蛋白質は、還元剤存在下



での SDS-PAGE において分子量約 70 キロダルトン (kDa) の  
ものが主であり、一部、約 55 kDa のものが存在する。また、ローヤ  
ルゼリー中に存在する配列表における配列番号 2 の部分アミノ酸配列を  
有する蛋白質について、同様に還元剤存在下での SDS-PAGE にて  
5 分子量を測定すると、約 55 kDa である。以下、本明細書では、配列  
表における配列番号 1 の部分アミノ酸配列を有する蛋白質の内、配列表  
における配列番号 3 のアミノ酸配列を有し、且つ、約 70 kDa の分子  
量を有する蛋白質を活性蛋白質 1-2 又は「RJP70」と、また、配  
列番号 2 の部分アミノ酸配列を有する蛋白質の内、配列表における配  
10 列番号 4 のアミノ酸配列を有し、且つ、約 55 kDa の分子量を有する蛋  
白質を活性蛋白質 2 又は「RJP55」と呼称することがある。

前述したように、本発明に用いる抗アレルギー蛋白質 RJP70 は配  
列表における配列番号 3 の、また、RJP55 は配列表における配列番  
号 4 のアミノ酸配列をそれぞれ有している。これらのアミノ酸配列をジ  
ェイ・シュミットゾーバ (J. Schmitzova) 等著、『セルラ  
15 ー・アンド・モレキュラー・ライフ・サイエンス (Cellular  
and Molecular Life Sciences)』、第  
54 巻、1, 020 乃至 1, 030 頁 (1998 年) で報告されている  
ローヤルゼリーの主要蛋白質 MRJP1、MRJP2、MRJP3、M  
20 RJP4、及び MRJP5 のアミノ酸配列比較したところ、RJP70  
の N 末端アミノ酸配列は MRJP3 の N 末端アミノ酸配列と、また、R  
JP55 の N 末端アミノ酸配列は MRJP1 の N 末端アミノ酸配列と完  
全に一致していた。更に、ジェイ・シュミットゾーバ等は、MRJP3  
としては分子量 60、63、66、70 kDa と、分子量が異なる複数  
25 の蛋白質が存在していることを報告しており、本発明に用いる配列表に  
おける配列番号 1 の部分アミノ酸配列を有する蛋白質にも分子量約 70

k D a の蛋白質 ( R J P 7 0 ) だけでなく、同一の部分アミノ酸配列を有し、約 5 5 k D a の分子量を示す蛋白質が認められている。また、R J P 5 5 は N 末端アミノ酸配列のみならず、分子量においても約 5 5 k D a と、M R J P 1 と一致している。また、ジェイ・シュミットゾーバ等は、M R J P 1 及び M R J P 3 は、ローヤルゼリー蛋白質のそれぞれ約 3 1 質量 %、約 2 6 質量 % を占めることを明かにしている。従って、本発明に用いる R J P 7 0 及び R J P 5 5 はそれぞれ M R J P 3 及び M R J P 1 と実質的に同一である可能性が高い。しかしながら、これらの蛋白質は、抗アレルギー作用などの生物作用に関しては、全く検討されていない。

本発明に用いる抗アレルギー蛋白質の調製方法としては、天然のローヤルゼリーから採取する方法以外にも、配列表における配列番号 3 又は 4 のいずれかで示されるアミノ酸配列をコードする D N A を用い、組換え D N A 技術を適用することによって、抗アレルギー蛋白質を調製することもできる。ミツバチは m R N A 又はゲノム D N A などの D N A の給源として有利に用いられる。本発明でいう抗アレルギー蛋白質 R J P 7 0 又は R J P 5 5 をコードする D N A の具体例としては、本発明者等による遺伝子解析の結果、クローン化された配列表における配列番号 5 又は 6 の塩基配列を有する D N A をそれぞれ挙げることができる。R J P 7 0 及び R J P 5 5 と極めて相同性の高い M R J P 3 及び M R J P 1 については、各遺伝子の塩基配列とコードされているアミノ酸配列が既に報告され、遺伝子データベース『ジェンバンク ( G e n B a n k ) 』に登録されており、それぞれアクセション番号 Z 2 6 3 1 8 ( 配列表の配列番号 7 )、A F 0 0 0 6 3 3 ( 配列表の配列番号 8 ) にて閲覧することができる。

上記のセイヨウミツバチからクローン化された R J P 7 0 及び R J P

5 5 をコードする DNA の塩基配列 (配列表における配列番号 5 及び 6) を、MRJP3 (配列番号 7) 及び MRJP1 (配列番号 8) とそれぞれ比較すると、RJP70 をコードする DNA の塩基配列は計 5 塩基が MRJP3 のものと異なっており、この相違に起因してコードされる RJP70 のアミノ酸配列も計 3 残基が異なっている。また、RJP55 をコードする DNA の塩基配列は MRJP1 のものと塩基配列が完全に一致している。ただし、MRJP1 の塩基配列中 1134 番目の塩基は不明とされているが、RJP55 の塩基配列における該当箇所はチミン「t」である。RJP70 と MRJP3 との相違点を表 1 に示す。

10 表 1 :

	番号	蛋白質	
		RJP70	MRJP3
塩基配列 相違位置*	770	G	A
	819	C	T
	820	T	C
	821	C	T
	861	G	C
アミノ酸配列 相違位置**	237	Cys	Tyr
	254	Ser	Leu
	267	Arg	Ser

\* 開始コドン ATG の A を 1 とした。

\*\* RJP70 のアミノ酸番号で表し、N末端アミノ酸の Ala を 1 とした。

本発明で用いる抗アレルギー蛋白質としては、配列表における配列番号 5 又は 6 に示す塩基配列にコードされるもの以外にも、配列番号 5 又は 6 に示す塩基配列の一部を含み、且つ、配列表における配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列をコードするものであればよい。なお、部位特異的変異などの慣用の組換え DNA 技術を適用し、斯かる DNA に塩基の欠失、置換、挿入及び／又は付加を導入することにより、斯かる DNA が本来的にコードする蛋白質の抗アレルギー作用を実質的に消失しない

範囲内で当該蛋白質に1個又は2個以上のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び／又は付加を導入してアミノ酸配列を改変することにも有利に実施できる。抗アレルギー活性を有する蛋白質RJP70とRJP55のアミノ酸レベルでの相同性が約66%であることから、抗アレルギー活性を保持するために、アミノ酸配列の改変は全体の約35%未満にとどめるのが望ましい。

配列表における配列番号5又は6の塩基配列を有するDNAは、本発明の抗アレルギー剤の有効成分である蛋白質を組換えDNA技術によって製造するために、有利に利用できる。これらRJP70又はRJP55をコードする配列表における配列番号5又は6の塩基配列を有するDNAを人為的に発現させて、抗アレルギー蛋白質を生成させ、生成した該蛋白質を採取することにより、本発明の抗アレルギー剤の有効成分である抗アレルギー蛋白質を得ることができる。上記のDNAを人為的に発現させるためには、例えば、常法にしたがって、適当な宿主細胞を形質転換してなる形質転換体の飼育又は培養により行うことができ、また、イン・ビトロでのDNAの発現系（イン・ビトロ転写及びイン・ビトロ翻訳）を利用することも随意である。

本発明で用いるRJP70又はRJP55を組換えDNA技術を適用して製造する際、用いる形質転換体は、通常、配列表の配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列をコードするDNA、例えば、配列表における配列番号5又は6の塩基配列を有するDNAを自律複製可能なベクターと連結して組換えDNAとし、この組換えDNAを適宜の宿主に導入することにより得ることができる。自律複製可能なベクターは、宿主の種類に応じて慣用のものから適宜選択すればよく、具体的にはpBR322、pUC18、Bluescript I I SK(+), pUB110、pTZ4、pC194、pHV14、TRp7、YEp7、及び

p B S 7 などのプラスミドベクター、 $\lambda$  g t  $\cdot$   $\lambda$  C、 $\lambda$  g t  $\cdot$   $\lambda$  B、 $\rho$  1 1、 $\phi$  1、及び $\phi$  1 0 5 などのファージベクターや、p V L 1 3 9 3 などのバキュロウィルスベクターが挙げられる。このうち、本発明の D N A を大腸菌で発現させるには、p U C 1 1 8、p U C 1 1 9、p U C 5 1 8、p U C 1 9、p B R 3 2 2、B l u e s c r i p t 1 1 S K (+)、 $\lambda$  g t  $\cdot$   $\lambda$  C、及び $\lambda$  g t  $\cdot$   $\lambda$  B などが好適である。一方、枯草菌で発現させるには、p U B 1 1 0、p T Z 4、p C 1 9 4、 $\rho$  1 1、 $\phi$  1、及び $\phi$  1 0 5 が好適である。p H V 1 4、T R p 7、Y E p 7、及び p B S 7 は、組換え D N A を二種以上の宿主内で複製させる場合に 10 有用である。以上のような自律複製可能なベクターは、通常、プロモーター、エンハンサー、複製起点、転写終結部位、選択配列などの、この発明の D N A が個々の宿主において発現するための、あるいは、所期の形質転換の有無を確認するための適宜塩基配列を含んでなる。以上のようなベクターとの連結には斯界で慣用の方法を適宜採用することができる。 15 例えば、リンカーの付加や P C R 法などによる制限酵素認識配列の付加、制限酵素処理、リガーゼ処理などはいずれも有用である。

上記のようなこの発明による D N A を導入する宿主細胞としては、形質転換体の作製に斯界で慣用される、大腸菌、枯草菌、酵母、黴などの適宜の微生物や、さらには、昆虫などの無脊椎動物、植物、脊椎動物な 20 どの細胞のいずれも用いることができる。本発明に用いる蛋白質をより天然型に近い形で提供するためには、昆虫細胞を宿主とするのが比較的望ましい。前記宿主にこの発明の D N A を導入するには、例えば、リン酸-カルシウム法、エレクトロポレーション法、ウイルス感染法、さらには、必要に応じて、D E A E - デキストラン法、リポフェクション法、 25 及びマイクロインジェクション法などを適宜適用すればよい。斯くして生成される形質転換体から目的とするのクローンを選択するには、導入

されたDNAの有無や抗アレルギー蛋白質の産生能を指標として試験すればよい。なお、以上述べた組換えDNA及び形質転換体に関しては、ジェイ・サムブルック等著、『モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版（1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行）に、慣用の材料及び方法が種々詳述されている。

以上のようにして得られる形質転換体は、宿主の種類やDNAの導入の際に用いたベクターの種類に応じて、適宜の条件下で培養すれば、その細胞内又は細胞外に抗アレルギー蛋白質を産生する。培養に用いる培地には、宿主細胞やベクターの種類にもよるけれども、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の培地を使用することができる。個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖、トレハロースなどの糖源が、又、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニア塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンステープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。宿主細胞やベクターの種類にもよるけれども、通常、20乃至60℃、pH2乃至10に保ちつつ、約1乃至6日間培養すれば、抗アレルギー蛋白質を含む培養物が得られる。

上記の組換えDNA技術を用いて得られる本発明で用いる蛋白質は、そのままの形態で利用可能であるが、通常、使用目的に応じて適宜の操作により精製して利用される。精製方法としては、前記、天然のローヤルゼリーからの採取の場合で述べた斯界で慣用の精製方法を適宜用いることができる。

本発明に用いる配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質は、抗体又はサイトカイン産生を抑

制する生物活性を有する。後記する実験例で示すように、本発明者らは  
O V A を抗原とし、A l u m をアジュバントとして免疫したマウス脾臓  
細胞を抗 C D 3 抗体で刺激した際のサイトカイン産生抑制作用を指標に  
して、ローヤルゼリー中の蛋白質を精製することにより、ローヤルゼリ  
5 ーが示す抗アレルギー活性の主体となる複数の蛋白質を R J P 7 0 及び  
R J P 5 5 として特定することに成功した。これらの蛋白質は、天然の  
ローヤルゼリーの場合と同様に、イン・ビトロ及びイン・ビボの試験に  
おいて、動物細胞の I L - 2 、 I L - 4 、 I F N -  $\gamma$  、 T N F -  $\alpha$  、 I  
g E 、 I g G などの各種サイトカイン又は抗体の産生を抑制することか  
10 ら、これらサイトカイン及び抗体の産生量の増加によって引き起こされ  
るアレルギーの発症を抑制したり、発症したアレルギー症状を緩和、治  
療に利用することができる。

本発明の抗アレルギー剤は、ローヤルゼリーにおける抗アレルギー成  
分である配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部分ア  
15 ミノ酸配列を有する蛋白質の含量が高いほど、著明な抗アレルギー作用  
を示す。本発明の抗アレルギー剤に含有する抗アレルギー成分は、高度  
に精製されたものであっても、部分精製されたものであっても、又は天  
然のままのものであっても良い。例えば、本発明の抗アレルギー剤は、  
後記実験例に記載されているサイトカイン産生抑制試験系により、蛋白  
20 質濃度 2 m g / m l の抗アレルギー剤を用いる場合、当該蛋白質を添加  
しない場合に比べて I L - 2 の相対産生量を 8 0 % 以下、又は、I L -  
4 の相対産生量を 6 0 % 以下までに低下させることが可能な量の当該蛋  
白質を、抗アレルギー成分として抗アレルギー剤に含有させるのが望ま  
しい。

25 本発明の抗アレルギー剤はアレルギー疾患のうち、とりわけアトピー  
性疾患に伴う諸症状を効果的に緩和する。アトピー性疾患とは皮膚炎、

枯草熱、気管支喘息、蕁麻疹、アレルギー性鼻炎、昆虫アレルギー、ダニアレルギーなど、各器官において先天的家族性に現れる過敏性疾患を指し、免疫グロブリンE（IgE）が関与するI型アレルギー反応によって発症する疾患も含まれる。

5 本発明の抗アレルギー剤の使用方法について説明すると、本発明の抗アレルギー剤は経口的に使用しても非経口的に使用しても、抗アレルギー作用を発揮することができる。本発明の抗アレルギー剤の有効な摂取量又は投与量は、対象とするヒトをはじめとする哺乳動物の種類、年齢、性別などに応じて適宜決定すればよく、例えば、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質の場合、  
10 有効成分の質量換算で、体重1kgあたり、通常、0.01mg乃至100mg/回、望ましくは、0.1mg乃至50mg/回、経口的に1日1回又は数回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔をおいて摂取するか又は投与すればよい。摂取・投与形態としては、特に  
15 に限定はなく、必要に応じて、例えば、経口経路、経管経路、経皮経路、経粘皮経路、経静脈経路などから適宜選択して使用すればよい。本発明の抗アレルギー剤を飲食物の形態にし、これを、経口抗アトピー用剤として用いる場合には、経済性などの点から、後述する実験2の試験系により、サイトカイン産生抑制活性がより高い天然のローヤルゼリーを選  
20 別し、これをそのまま用いることもできる。

また、本発明の抗アレルギー剤を、例えば、化粧品などの皮膚外用剤として皮膚に直接塗布する場合、配合するローヤルゼリー由来の抗アレルギー成分の量は、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質の質量換算で、皮膚外用剤全量中、  
25 0.001乃至10質量%、好ましくは、0.01乃至1質量%であり、1日1回又は数回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔を



において直接皮膚に塗布すればよい。なお、0.001質量%未満では、その効果は発揮され難くなり、また、10質量%を越えると、配合量の割に効果がなく経済的に好ましくないことから、通常、上記の範囲で配合する。

5      本発明の抗アレルギー剤は、例えば、飲食物、化粧品、医薬品をはじめとする組成物の形態としても有利に利用できる。斯かる組成物には、ローヤルゼリー若しくは抗アレルギー蛋白質とともに、例えば、シソ属植物及びパフィア (*P f a f f i a*) 属植物などの加工物などの抗アレルギー作用を持つ成分も必要に応じて配合することができ、通常、例え  
10      ば、飲食物分野、化粧品分野、医薬品分野などで有利に用いることができる。更に、必要に応じて、ヒトを含む哺乳類への経口的又は経皮的適用ないしは皮膚外用が許容される成分として、飲食物、化粧品、医薬品等の分野で通常使用される、例えば、水、アルコール、澱粉質、蛋白質、アミノ酸、繊維質、糖質、脂質、脂肪酸、ビタミン、ミネラル、着香料、  
15      着色料、甘味料、調味料、香辛料、防腐剤、乳化剤、界面活性剤、賦形剤、増量剤、増粘剤、保存剤などの上記で述べた以外の成分を1種又は2種以上含有させることも有利に実施できる。これらの成分は、通常、本発明の抗アレルギー剤の各々の利用分野における必要性に応じて適宜選択される。以上のような成分を含む組成物の形態には特に制限はなく、  
20      例えば、粉末、顆粒、錠剤、ペースト、ゼリー、乳液、溶液などの所望の形態で提供される。

前記糖質としては、ブドウ糖、果糖、ラクトース、トレハロース、マルトース、蔗糖、ラクトスクロース、水飴などの糖類、サイクロデキストリン、環状四糖などの環状の糖類、エリスリトール、マンニトール、  
25      ソルビトール、キシリトール、マルチトール、還元水飴などの糖アルコール類、アスパルテーム、ステビア抽出物、スクラロースなどの高甘味

度甘味料、プルラン、カラギーナンなどの天然多糖類、天然ガム類、合成品のカルボキシメチルセルロースなどの増粘剤などの1種又は2種以上を添加することにより、固状のものにあつてはその賦形性に有利に利用できるだけでなく、本発明の抗アレルギー剤の安定化、呈味改善、風味保持などに有利に利用できる。

本発明の抗アレルギー剤を配合してなる組成物を製造するには、対象とする動物類やその摂取方法又は投与方法などを考慮して、本発明の抗アレルギー剤と、飲食物、化粧品、医薬品、医薬部外品、飼料、餌料、ペットフードなどの分野において使用可能な1種又は2種以上の成分とを、適宜の配合比率で混合し、適宜、希釈、濃縮、乾燥、濾過、遠心分離などの工程を実施して、所望の形状に成形して抗アレルギー剤を配合してなる組成物を調製すればよい。各成分を配合する順序や、当該工程を実施する時期は、本発明の抗アレルギー剤の効果が損なわれない限り、その順序や時期に制限はない。

本発明の抗アレルギー剤を配合してなる組成物を飲食物の形態として用いる場合には、例えば、アイスクリーム、アイスキャンデー、シャーベットなどの氷菓、氷蜜などのシロップ、バタークリーム、カスタードクリーム、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのスプレッド及びペースト、チョコレート、ゼリー、キャンディー、グミゼリー、キャラメル、チューインガム、プリン、シュークリーム、スポンジケーキなどの洋菓子、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖菓などの加工果実ないしは加工野菜、まんじゅう、ういろう、あん、羊羹、水羊羹、カステラ、飴玉などの和菓子、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの調味料などが挙げられる。望ましい飲料の形態としては、例えば、合成酒、醸造酒、果実酒、洋酒などの酒類、ジュ-

ス、ミネラル飲料、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料、スポーツドリンク、ドリンク剤、茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、ココアなどの清涼飲料などが挙げられる。

化粧品の形態として用いる場合には、例えば、ローション、クリーム、  
5 乳液、ゲル、粉末、ペースト、ブロックなどの形態で、石けん、化粧石  
けん、肌洗い粉、洗顔クリーム、洗顔フォーム、フェイシャルリンス、  
ボディーシャンプー、ボディーリンス、ヘアシャンプー、ヘアリンス、  
髪洗い粉などの清浄用化粧品、セットローション、ヘアブロー、チック、  
ヘアクリーム、ポマード、ヘアスプレー、ヘアリキッド、ヘアトニック、  
10 ヘアローション、養毛料、染毛料、頭皮用トリートメント、びん付油、  
つや出し油、髪油、スキ油などの頭髪化粧品、化粧水、バニシングクリ  
ーム、エモリエントクリーム、エモリエントローション、パック用化粧  
料（ゼリー状ピールオフタイプ、ゼリー状ふきとり型、ペースト状洗い  
流し型、粉末状など）、クレンジングクリーム、コールドクリーム、ハン  
15 ドクリーム、ハンドローション、乳液、保湿液、アフターシェービング  
ローション、シェービングローション、プレシェーブローション、アフ  
ターシェービングクリーム、アフターシェービングフォーム、プレシェ  
ーブクリーム、化粧用油、ベビーオイルなどの基礎化粧品、ファンデー  
ション（液状、クリーム状、固型など）、タルカムパウダー、ベビーパウ  
20 ダー、ボディパウダー、パヒュームパウダー、メイクアップベース、お  
しろい（クリーム状、ペースト状、液状、固型、粉末など）、アイシャド  
ウ、アイクリーム、マスカラ、眉墨、まつげ化粧料、頬紅、頬化粧水な  
どのメイクアップ化粧品、香水、練香水、粉末香水、オーデコロン、パ  
フュームコロン、オードトワレなどの芳香化粧品、日焼けクリーム、日  
25 焼けローション、日焼けオイル、日焼け止めクリーム、日焼け止めロー  
ション、日焼け止めオイルなどの日焼け・日焼け止め化粧品、マニキュ

ア、ペディキュア、ネイルカラー、ネイルラッカー、エナメルリムーバー、ネイルクリーム、爪化粧料などの爪化粧品、アイライナー化粧品、口紅、リップクリーム、練紅、リップグロスなどの口唇化粧品、練歯磨、マウスウォッシュなどの口腔化粧品、バスソルト、バスオイル、浴用化粧料などの入浴用化粧品などが挙げられる。

医薬品の形態として用いる場合には、例えば、エキス剤、エリキシル剤、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、眼軟膏剤、口腔粘膜貼付剤、懸濁剤、乳剤、硬膏剤、座剤、散剤、酒精剤、錠剤、シロップ剤、注射剤、チンキ剤、点眼剤、点耳剤、点鼻剤、トローチ剤、軟膏剤、芳香水剤、鼻用噴霧剤、リモナーデ剤、リニメント剤、流エキス剤、ローション剤、湿布剤、噴霧剤、塗布剤、浴剤、貼付剤、パスタ剤、パップ剤などが挙げられる。以上のような形態の本発明の抗アレルギー剤を配合してなる組成物を製造するには、目的とする製品を慣用の製造方法にしたがって製造する過程の適宜の時期に本発明の抗アレルギー剤を添加すればよい。

ただし、目的とする製品の製造工程に加熱工程がある場合には、製造工程での抗アレルギー作用の減衰を防ぐために、本発明の抗アレルギー剤は、加熱工程の前に添加すべきでなく、例えば、加熱工程の後に30℃以下、望ましくは常温にまで冷却した後に添加するのが望ましい。以上のような本発明の組成物は、本発明の抗アレルギー剤を、組成物中に、通常、0.01質量%以上、望ましくは、0.1乃至100質量%含有する。

本発明の抗アレルギー剤を医薬品としてアレルギー疾患の治療、予防に用いる場合の適応症としては、例えば、前記したアトピー性疾患全般に加えて、金属アレルギー、遅延型接触皮膚炎、食物アレルギー、薬物アレルギー、化学物質過敏症などが挙げられる。また、本発明の抗アレルギー剤は、IL-2、IL-4、IFN- $\gamma$ やTNF- $\alpha$ の産生を抑

制することから、自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、多発性筋炎、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、強皮症、多発性結節性動脈炎、活動性慢性肝炎、萎縮性胃炎、自己免疫性溶血性貧血、無精子症、バセドウ病、ベーチェット症候群、C R T S 症候群、寒冷凝集素性溶血性貧血、潰瘍性大腸炎、グッドパスチャー症候群、甲状腺機能亢進症、慢性甲状腺炎、特発性アジソン病、特発性血小板減少性紫斑病、若年性糖尿病、白血球減少症、重症筋無力症、発作性寒冷血色素尿症、悪性貧血、原発性胆汁性肝硬変症、シーグレン症候群、交換性眼炎、全身性紅斑性狼そう、ウェジナー肉芽腫症などの症状の緩和・治療にも有利に利用できる。

10 以上のように本発明の抗アレルギー剤は、抗アレルギー作用を示す上、摂取した生体に悪影響を与えないので、日常的に利用することにより、利用した生体において抗アレルギー作用が効果的に発揮され、重篤な副作用を惹起することなく、その生体の抵抗力の増強によるアレルギー疾患の予防、早期緩和、治療、及び健康な状態の維持などが達成される。

15 したがって、本発明の抗アレルギー剤は、アレルギー疾患を予防・緩和・治療するための飲食物・化粧品・医薬品などとして極めて有用である。特に、化粧品として利用する場合には、皮膚疾患の予防ならびに該疾患に対する治療効果の改善などに奏効する。

最近、ローヤルゼリーが、抗アレルギー作用を発揮することがエイチ・オカ等『バイオセラピー ( B i o t h e r a p y ) 』、第 1 4 巻、1 4 5 頁乃至 1 5 0 頁 ( 2 0 0 0 年 ) や、エム・カタオカ等『ナチュラル・メディシNZ ( N a t u r a l M e d i c i n e s ) 』、第 5 5 巻、1 7 4 頁乃至 1 8 0 頁 ( 2 0 0 1 年 ) によって報告されている。しかしながら、これらの報告は、ローヤルゼリーが有する抗アレルギー作用の主体となる物質が、ローヤルゼリーに含まれる蛋白質、糖質、脂質、又はそれら以外の物質のいずれであるか全く言及していない。したがって、抗

アレルギー作用の主体物質が配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質であること、及び、サイトカイン産生抑制活性が後記する実験 2 の試験方法によって高いと認められたローヤルゼリーは、経口投与により、後記実験 7 で示したように  
5 著明な抗アトピー作用を発揮することについてを明らかにしたのは本発明をもって嚆矢とする。

以下に、本発明に用いるローヤルゼリー及び抗アレルギー蛋白質について、具体的な実験例をあげて本発明をさらに詳しく説明する。

#### 10 実験 1 : ローヤルゼリー水溶性蛋白質画分の調製

凍結保存していた生ローヤルゼリー（ブラジル産）25 g を室温にて融解し、20 mM トリスー塩酸緩衝液（pH 8.0）に懸濁した後、低分子物質を除去するために同緩衝液 5 L に対して透析した。次いで、得られた透析内液を遠心分離（12,000 rpm、15 分）することにより不溶性物質を除去し、さらにポアサイズ 0.22  $\mu$ m のフィルター  
15 でろ過して、ローヤルゼリー水溶性蛋白質画分を得た。

#### 実験 2 : マウス脾臓細胞を用いたサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性の測定

20 OVA を抗原とし、Alum をアジュバントとして 3 回免疫した BALB/c マウスより回収した脾臓細胞を  $5 \times 10^6$  個 / ml に調製し、抗 CD3 抗体（5  $\mu$ g / ml）で固相化した 96 ウェルのマイクロプレートに、100  $\mu$ l ずつ播きこんだ。次いで、実験 1 で用いた生ローヤルゼリー又は実験 1 で得たローヤルゼリー水溶性蛋白質画分を、蛋白質  
25 濃度 2.0 mg / ml 及び 4.0 mg / ml に調製し、これを 50  $\mu$ l ずつ添加した。更に、各ウェルに培地を 50  $\mu$ l 添加し、総液量 200

μ l とした。40 時間培養した後に培養上清液を回収し、IL-2、IL-4 の各サイトカイン量を常法の、固相酵素免疫測定法（ELISA 法）にて測定した。ローヤルゼリー水溶性蛋白質画分の代わりにリン酸緩衝生理食塩水（以下、本明細書では単に PBS（-）と略称する。）を用いて同様に行ったものを対照とした。対照のサイトカイン産生量を 100 % として生ローヤルゼリー及びローヤルゼリー水溶性蛋白質画分の相対的なサイトカイン産生量をパーセントで表した。結果を表 2 に示した。

表 2 :

試 料	蛋白濃度 (mg/ml)	相対サイトカイン産生率(%)	
		IL-2	IL-4
対照1 PBS(-)	-	100	100
対照2 生RJ	2.0	103	73
	4.0	72	34
RJ水溶性蛋白質画分	2.0	76	54
	4.0	43	16

RJ:ローヤルゼリー, IL-2:インターロイキン2, IL-4:インターロイキン4

10

表 2 の結果から明らかなように、試験した生ローヤルゼリー及びローヤルゼリー水溶性蛋白質画分は用量依存的に IL-2、IL-4 の産生を抑制した。生ローヤルゼリーの場合、蛋白質濃度 2.0 mg/ml のときの IL-2 相対産生率及び IL-4 相対産生率はそれぞれ 103 %、73 % であった。ローヤルゼリー水溶性蛋白質画分の場合、蛋白質濃度 2.0 mg/ml のときの IL-2 相対産生率及び IL-4 相対産生率はそれぞれ 76 %、54 % であった。これらの結果から、透析、遠心分離などの精製操作を加え、蛋白質以外の糖質などの水溶性低分子物質及び不溶性物質を除くことにより、生ローヤルゼリーに比べて蛋白質当りのサイトカイン産生抑制活性（抗アレルギー活性）を高めたローヤル

20

ゼリー標品が得られることが判明した。

実験 3 : 生ローヤルゼリーからの抗アレルギー活性蛋白質の精製及びその理化学的性質

5 実験 3 - 1 : 生ローヤルゼリーからの抗アレルギー活性蛋白質の精製

実験 2 で認められた O V A / A l u m で免疫したマウス脾臓細胞のサイトカイン産生抑制活性を指標として、生ローヤルゼリーから抗アレルギー活性蛋白質を精製した。また、同時に細胞増殖能を、酸化-還元インディケーターである色素 (トレック・ダイアグノスティック社製、商品名『アラマー・ブルー (a l a m a r B l u e)』) を用いて 5 4 4 n m を励起波長とし、5 9 0 n m を測定波長として蛍光強度を測定した。実験 1 で得たローヤルゼリー水溶性蛋白質画分を、『D E A E - 5 P W』ゲル (株式会社東ソー製) を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (ゲル量 5 4 m l) に供したところ、サイトカイン産生抑制活性及び細胞増殖抑制活性を有する蛋白質は D E A E - 5 P W ゲルに吸着した。蛋白質の溶出を 2 8 0 n m の吸光度を測定することにより追跡しながら、吸着した蛋白質を食塩濃度 0 M から 0 . 3 M に上昇するリニアグラジエントで溶出させ、第 2 図に示すように食塩濃度約 0 . 0 8 M 付近で溶出する活性蛋白質 (第 2 図における太線 1) と、0 . 1 7 乃至 0 . 2 5 M 付近に溶出する活性蛋白質 (第 2 図における太線 2) の 2 種の蛋白質を分離、回収した。便宜上、本明細書では、前者を「活性蛋白質 1」と、後者を「活性蛋白質 2」と称する。以下、これらを別々の精製工程により精製した結果を示す。

25 実験 3 - 2 : 活性蛋白質 1 の精製

実験 3 - 1 で得た活性蛋白質 1 を含有するフラクションを食塩濃度 0 .



0.1 M の 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して透析し、その透析内液を『リソース (Resource) Q』ゲル (アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (ゲル量 6 ml) に供した。活性蛋白質 1 はリソース Q ゲルに吸着し、食塩濃度 0 M から 0.5 M に上昇するリニアグラジエントで溶出させたところ、食塩濃度約 0.1 M 付近で溶出した。活性画分を回収し、その食塩濃度を 0.05 M に調製するために、同食塩濃度の緩衝液に対して透析し、その透析内液を『ヘパリン (Heparin) - 5PW』ゲル (株式会社東ソー製) を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィー (ゲル量 3.3 ml) に供した。その結果を第 3 図に示す。活性蛋白質 1 はヘパリン-5PW ゲルに吸着し、食塩濃度 0 M から 1 M に上昇するリニアグラジエントで溶出させ、実験 2 及び実験 3-1 の方法でサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性を有する画分を調べたところ、第 3 図における太線 1 で示される食塩濃度約 0.15 M 付近で溶出する活性蛋白質 (以下、本明細書では、これを「活性蛋白質 1-1」と称する) と、第 3 図における太線 2 で示される約 0.35 M 付近に溶出する活性蛋白質 (以下、本明細書では、これを「活性蛋白質 1-2」と称する) の 2 種が検出された。両者は後述するように同一の N 末端アミノ酸配列を有しており、活性蛋白質 1-2 が活性蛋白質 1-1 よりも分子量が大きく比活性も高いことから、活性蛋白質 1-2 を選択し、更に精製した。活性蛋白質 1-2 を含有するフラクションを『スーパーデックス (Superdex) 200』ゲル (アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (ゲル量 320 ml) に供し、1.5 倍濃度の PBS (リン酸緩衝液) を用いて溶出した。この活性画分を回収し、OVA/Alum で免疫したマウス脾臓細胞のサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性を有する精製活性蛋白質 1 を得た。活

性蛋白質 1 の各精製ステップに於ける蛋白量、比活性を表 3 に示す。(但し、表 3 中、ヘパリン-5PW 回収区以降は活性蛋白質 1-2 の数値を表す。)

表 3 :

精製ステップ	液量 (ml)	全蛋白 (mg)	相対 IL-4 産生 (%)*
ローヤルゼリー水溶性画分	475	1057	9
DEAE-5PW 回収区	325	114	23
Resource Q 回収区	40	80	<2
Heparin-5PW 回収区	95	38	24
Superdex 200 回収区	20	30	6

\* 各精製ステップにおける回収区の前液を用いた際の値

得られた精製活性蛋白質 1 を還元剤ジチオスレイトール (D T T) 存在下でゲル濃度 10% (w/v) の SDS-PAGE に供し、精製標品の純度を検定したところ、蛋白質バンドは単一で、純度の高い標品であった。

### 実験 3-3 : 活性蛋白質 1 の理化学的性質

#### (1) 分子量

実験 3-2 で得た O V A / A l u m で免疫したマウス脾臓細胞のサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性を有する精製活性蛋白質 1-2 と、同じく実験 3-2 で得た部分精製活性蛋白質 1-1 を実験 3-2 と同様に還元剤 D T T 存在下での SDS-PAGE に供し、同時に泳動した分子量マーカー (アマシャム・バイオサイエンス社製、商品名『L M W エレクトロフォoresis キャリブレーション・キット (L M W E l e c t r o p h o r e s i s C a r i b r a t i o n K i t)』) と比較して当該活性蛋白質の分子量を測定したところ、活性蛋白質 1-

2 は分子量約 70 kDa に相当する位置に、また、活性蛋白質 1-1 は分子量約 55 kDa に相当する位置に、それぞれ蛋白質バンドが検出された。

## (2) N 末端アミノ酸配列

5 実験 3-2 で得た活性蛋白質 1-2 精製標品及び活性蛋白質 1-1 部分精製標品の N 末端アミノ酸配列 10 残基を、常法により、プロテインシーケンサー（アプライド・バイオシステムズ社製、モデル 473A）を用いて分析したところ、両者とも同一の、配列表における配列番号 1 の N 末端アミノ酸配列を有していた。両者の内、約 70 kDa の分子量  
10 を有する活性蛋白質 1-2 を本発明者は RJP70 と命名した。

## 実験 3-4：活性蛋白質 2 の精製

実験 3-1 で得た活性蛋白質 2 を含有するフラクションを食塩濃度 0.01 M の 20 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）に対して透析し、  
15 その透析内液を『リソース（Resource）Q』ゲル（アマシャム・バイオサイエンス社製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（ゲル量 6 ml）に供した。活性蛋白質 2 はリソース Q ゲルに吸着し、食塩濃度 0.1 M から 0.4 M に上昇するステップグラジエントで溶出させた。活性画分を回収し、活性蛋白質 2 を含有するフラクシ  
20 ョンを『スーパーデックス（Superdex）200』ゲル（アマシャム・ファルマシア・バイオテク製）を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィー（ゲル量 320 ml）に供し、1.5 倍濃度の PBS（-）を用いて溶出した。活性画分は 2 つ認められたものの、両者は還元剤存在下での SDS-PAGE において同一の約 55 kDa の分子量を示し、  
25 同一の蛋白質が単量体と多量体として分離したと考えられた。この活性画分を両方まとめて回収し、OVA/Alum で免疫したマウス脾臓細

胞のサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性を有する精製活性蛋白質 2 を得た。活性蛋白質 2 の各精製ステップに於ける蛋白質量、比活性を表 4 に示す。

表 4 :

精製ステップ	液量 (ml)	全蛋白 (mg)	相対 IL-4 産生 (%)*
DEAE-5PW 回収区	88	40.7	61.2
Resource Q 回収区	2.8	36.3	22.8
Superdex 200 回収区	8.5	23	18.9

\* 各精製ステップにおける回収区の原液を用いた際の値

精製活性蛋白質 2 を還元剤 D T T 存在下でゲル濃度 1 0 % ( w / v ) の S D S - P A G E に供し、精製標品の純度を検定したところ、蛋白質バンドは単一で、純度の高い標品であった。

## 10 実験 3 - 5 : 活性蛋白質 2 の理化学的性質

### ( 1 ) 分子量

実験 3 - 4 で得た精製活性蛋白質 2 を実験 3 - 3 と同様に還元剤 D T T 存在下での S D S - P A G E に供したところ、分子量約 5 5 k D a に相当する位置に蛋白質バンドが検出された。

### 15 ( 2 ) N 末端アミノ酸配列

実験 3 - 4 で得た精製活性蛋白質 2 の N 末端アミノ酸配列を、常法により、プロテインシーケンサー ( アプライド・バイオシステムズ社製、モデル 4 7 3 A ) を用いて 2 5 残基分析したところ、配列表における配列番号 2 の N 末端アミノ酸配列を有していた。活性蛋白質 2 を本発明者は R J P 5 5 と命名した。

#### 実験 4 : R J P 7 0 精製標品のサイトカイン産生抑制作用

実験 3 - 2 で得た R J P 7 0 精製標品を用いて、段階希釈法により、  
11.7、23.4、46.9、93.8、188、及び 375  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の溶液を調製し、実験 2 と同様に、R J P 7 0 精製標品のマ  
ウス脾臓細胞に対するサイトカイン産生抑制作用を調べた。また、実験  
3 - 1 と同様の方法で細胞増殖能を調べた。結果を表 5 に示した。

表 5 :

試 料	サイトカイン産生及び細胞増殖率(%)		
	IL-2	IL-4	細胞増殖
対照 (PBS(-))	100	100	100
RJP70精製標品 11.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$	78	93	96
23.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	84	105	100
46.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	62	57	83
93.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$	70	41	68
188 $\mu\text{g}/\text{ml}$	63	33	68
375 $\mu\text{g}/\text{ml}$	42	8	49

IL-2: インターロイキン2, IL-4: インターロイキン4

表 5 から明らかなように、R J P 7 0 精製標品は用量依存的に I L -  
2 及び I L - 4 の産生を抑制し、且つ、細胞の増殖を抑制した。

#### 実験 5 : R J P 7 0 精製標品の T 細胞又はマクロファージに対する作用 と細胞障害性

##### 実験 5 - 1 : R J P 7 0 精製標品の T 細胞に対する作用と細胞障害性

R J P 7 0 の T 細胞に対する直接的な作用と細胞障害性を調べるため  
にマウス脾臓細胞から精製した C D 4 + T 細胞を抗 C D 3 抗体で刺激す  
る試験系で活性を確認した。実験 2 の方法で調製した B A L B / c マウ  
ス脾臓細胞を 10 ( v / v ) % ウシ胎仔血清 ( F C S ) を含む R P M I  
1640 培地に懸濁し、F C S でコートしたシャーレで 37  $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間

保持し、接着性の細胞を除去した。続いて、ヤギ抗マウス Ig でコートしたシャーレを同様に用いて、B 細胞を除去した。更に、抗マウス CD 4 抗血清でコートしたシャーレに接着する細胞を回収することにより、CD 4<sup>+</sup>T 細胞を得た (CD 4<sup>+</sup>T 細胞含量 91 乃至 93%)。

- 5 実験 3-2 の方法で得た RJP70 精製標品と、この CD 4<sup>+</sup>T 細胞を用い、実験 2 と同様にしてサイトカイン産生抑制作用を調べた。RJP70 精製標品を段階希釈法により、31.3、62.5、125、250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の溶液を調製し、IL-2、IL-4 及び IFN- $\gamma$  の産生抑制作用を調べた。RJP70 精製標品に代えて PBS (-) を用いた以外は同様に処理したものを対照とし、対照のサイトカイン産生量を 100 としたときの相対値を算出した。また、トリパンブルー色素排除法により、用いた CD 4<sup>+</sup>T 細胞の生細胞と死細胞の数を調べ、次式で生存細胞比率 (%) を求め、細胞障害性の指標とした。結果を表 6 に示した。

- 15 数式 1 :

$$\text{生存細胞比率 (\%)} = \{ \text{生細胞数} / (\text{生細胞数} + \text{死細胞数}) \} \times 100$$

表 6 :

試料	サイトカイン産生率 (%)			生存細胞比率 (%)
	IL-2	IL-4	IFN- $\gamma$	
対照 (PBS(-))	100	100	100	84.1 $\pm$ 2.4
RJP70 精製標品 31.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$	78	97	96	83.8 $\pm$ 2.5
62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	59	84	91	82.7 $\pm$ 1.9
125 $\mu\text{g}/\text{ml}$	24	68	68	84.6 $\pm$ 0.1
250 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3	13	27	85.0 $\pm$ 1.5

IL-2: インターロイキン 2, IL-4: インターロイキン 4, IFN- $\gamma$ : インターフェロン  $\gamma$

- 20 表 6 から明らかなように、RJP70 は CD 4<sup>+</sup>T 細胞を用いた系でもマウス脾臓細胞の系 (実験 4) とほぼ同様な傾向で IL-2、IL-4 の産生を抑制し、また、IFN- $\gamma$  の産生も抑制した。このとき、生

存細胞の比率は対照と同等であり、R J P 7 0 に細胞障害性は認められなかった。

## 実験 5 - 2 : R J P 7 0 精製標品のマクロファージに対する作用と細胞障害性

R J P 7 0 のマクロファージに対する直接的な作用と細胞障害性を調べるために、マウス腹腔から採取したマクロファージをリポポリサッカライド ( L P S ) 及び I F N -  $\gamma$  で刺激する試験系で活性を確認した。マウス末梢マクロファージを調製するために、3 % ブリュウウェルのチオグリコレート培地を B A L B / c マウスの腹腔に 2 m l 注射し、3 乃至 4 日後に腹水を採取した。腹水を 1 0 ( v / v ) % ウシ胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地で希釈して、細胞濃度  $1 \times 10^6$  個 / m l にした後、プラスチック製シャーレに 1 0 m l ずつ播種した。5 % 炭酸ガス雰囲気中で 3 7  $^{\circ}$ C で 2 時間培養した後、培地を除去して、2 回上記培地で濯ぎ、シャーレに付着しなかった細胞を除去し、シャーレに残った付着細胞を上記培地でセルスクレーパーを用いて回収し、マクロファージとして今後の実験に用いた。実験 3 - 2 の方法で得た R J P 7 0 精製標品と、このマクロファージを用い、実験 2 と同様にしてサイトカイン産生抑制作用を調べた。R J P 7 0 精製標品を段階希釈法により、1 5 0 、3 0 0 、6 0 0  $\mu$  g / m l の濃度の溶液を調製し、T N F -  $\alpha$  及び I L - 6 の産生抑制作用を調べた。R J P 7 0 精製標品に代えて P B S ( - ) を用いた以外は同様に処理したものを対照とし、対照のサイトカイン産生量を 1 0 0 としたときの相対値を算出した。また、トリパンブルー色素排除法により、用いたマクロファージの生細胞と死細胞の数を調べ、上記数式 1 で生存細胞比率 ( % ) を求め、細胞障害性の指標とした。結果を表 7 に示した。

表 7 :

試 料	サイトカイン産生率(%)		生存細胞 比率(%)
	TNF- $\alpha$	IL-6	
対照(PBS(-))	100	100	100
RJP70精製標品 150 $\mu$ g/ml	85	103	96
RJP70精製標品 300 $\mu$ g/ml	74	98	92
RJP70精製標品 600 $\mu$ g/ml	28	99	100

表 7 から明らかなように、R J P 7 0 はマクロファージを用いた系において、L P S 及び I F N -  $\gamma$  存在下での T N F -  $\alpha$  の産生を抑制した。

- 5 一方、同じ炎症性サイトカインとして分類される I L - 6 の産生を抑制しなかった。このとき、生存細胞の比率は対照と同等であり、R J P 7 0 に細胞障害性は認められなかった。

実験 6 : ローヤルゼリー及び R J P 7 0 精製標品の抗体産生抑制作用

- 10 ローヤルゼリー又は R J P 7 0 の投与が、O V A / A l u m で免疫したマウスの抗体産生に及ぼす影響を調べた。雌性 B A L B / c マウス(7 週齢、日本チャールスリバー株式会社)各 5 匹に対し、一週間おきに 3 回、O V A 2  $\mu$  g / A l u m 3 m g を腹腔内投与にて免疫した。ローヤルゼリーは実験 1 で用いたものを使用し、P B S (-) に溶解したものをマウス 1 匹当たり 1 回に 5 0  $\mu$  g となるように、また、R J P 7 0 は
- 15 実験 3 - 2 の方法で得たものを使用し、同じく P B S (-) に溶解した精製標品をマウス 1 匹当たり 1 回に 0 . 5 、 5 、 5 0  $\mu$  g となるようにして、3 回行われた各免疫操作 ( O V A / A l u m 投与 ) の 2 日前、6 時間前の 2 回にわたり、計 6 回、腹腔内投与した。また、対照として P
- 20 B S (-) を用いて同様に行った。試験群を表 8 にまとめた。



表 8 :

群	投与試料	投与量・回数	匹数	免疫(IgE 誘導)方法
1	PBS(-)(対照1)	—	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内
2	ローヤルゼリー(対照2)	50 $\mu$ g/匹・6回	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内
3	RJP70	50 $\mu$ g/匹・6回	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内
4	RJP70	5 $\mu$ g/匹・6回	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内
5	RJP70	0.5 $\mu$ g/匹・6回	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内

OVA:卵白アルブミン(抗原)

Alum:水酸化アルミニウムゲル(アジュバント)

3 回目の免疫から一週間後に採血し、血清中の各種抗体濃度を酵素免疫測定法(EIA法)により測定した。抗OVA-IgE抗体価はキャ  
 5 プチャードEIA法により測定し、標準血清(640U/ml)を用いて作成した検量線より算出した。また、抗OVA-IgG1抗体価は間接EIA法により測定し、標準血清(128,000U/ml)を用いて作成した検量線より算出した。各測定値の統計処理は対照群と試験群  
 10 の間で分散性を検討し、T検定或いはウェルヒ(Welch)法により有意差検定を行った。1群5匹での各測定値の中に他とかけ離れた値がある場合にはスミルノフ(Smirnov)の棄却検定に従った。測定した結果を、抗OVA-IgE抗体価について第4図に、また、抗OVA-IgG1抗体価について第5図に示した。

第4図から明らかなように、ローヤルゼリーとRJP70のいずれに  
 15 も抗OVA-IgE抗体価を低下させる作用が認められた。ローヤルゼリー投与群の抗OVA-IgE抗体価は対照(PBS(-)投与群)と比較して、61%の有意な抑制が認められた。また、RJP70精製標品投与群では投与量に依存して抗OVA-IgE抗体価が低くなり、その抑制率は0.5  $\mu$ g/匹投与群で13%、5  $\mu$ g/匹投与群で39%、  
 20 50  $\mu$ g/匹投与群で67%であった。また、第5図から明らかなよう

に、抗OVA-IgG1抗体価もIgEの場合とほぼ同様に、ローヤルゼリー投与群及びRJP70精製標品のすべての投与群で46～82%の有意な抑制が認められた。

以上の結果より、本発明に用いるローヤルゼリー及びRJP70には  
5 IgE、IgG1抗体の産生を抑制する作用があり、アレルギー反応を抑制することが確認された。

#### 実験7：アトピー性皮膚炎の発症抑制作用

Nc/Ngaマウス（雌、5週齢、日本チャールスリバー社販売）に  
10 対して、ピクリルクロライドを塗布することによりアトピー性皮膚炎と酷似する皮膚炎を誘発させて作成したアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、実験1で用いた生ローヤルゼリー及び実験3-2の方法で得たRJP70のアトピー性皮膚炎の発症抑制作用を調べた。まず、バリカンで剃毛したマウスの腹部及び胸部にエタノール：アセトン（容量比4：  
15 1）の混合液に5%（w/v）の濃度に溶解したピクリルクロライド溶液を塗布して初回感作を行った。初回感作より4日めにオリーブ油に1%（w/v）の濃度に溶解したピクリルクロライド溶液を麻酔したマウス背部及び耳介に塗布した。その後、1週間おきにさらに計5回、同溶液を背部及び耳介に塗布した。実験1で用いた生ローヤルゼリー（1.  
20 0mg/マウス）又は実験3-2の方法で得たRJP70精製標品（0.3mg/マウス）を、胃ゾンデを用いて初期感作の3日前より1日に1回、週5回、6週間、10匹のマウスに経口投与した。対照としてPBS（-）を同様に10匹のマウスに経口投与した。ピクリルクロライドによる初回感作から3週めより週に2回、皮膚症状（掻痒症、発赤・出血、浮腫、擦傷・組織欠損、痂皮形成・乾燥）を肉眼にて判定し、評価  
25 した。

生ローヤルゼリー投与群及びRJP70投与群は対照群と比べて有意に症状が軽く、アトピー性皮膚炎の発症を抑制していた。この結果は本発明に用いるローヤルゼリー及び抗アレルギー蛋白質RJP70が、アトピー性のアレルギー症状を緩和する作用を有する物質であることを示している。

#### 実験8：急性毒性試験

5 質量%アラビアガムを含む生理食塩水にRJP70又はRJP55の適量をそれぞれ溶解した後、常法に従って過除菌した。これらを体重20乃至25gのddYマウス(10匹/群)の腹腔内に注射投与するか、胃ゾンデにより経口投与した後、7日間に亘って経過を観察した。その結果、いずれの試料、いずれの投与経路によっても、試みた最大投与量である10mg/kg体重においても死亡例が認められなかった。この結果は本発明に用いる抗アレルギー蛋白質RJP70及びRJP55が、ヒトを含む哺乳類に常用しても安全な物質であることを示している。

#### 実験9：RJP70及びRJP55をコードするDNA(cDNA)のクローニング

##### 20 実験9-1：ミツバチからの全RNAの調製

全RNAの調製は、通常のグアニジンチオシアネート/酸性フェノール：クロロフォルム法を採用したRNA調製キット(アンピオン社製、商品名『トータルRNAキット(TOTALLY RNA kit)』)を用い、キットに添付された説明書に従って行った。まず、セイヨウミツバチ(*Apis mellifera* L.)の成虫12匹の頭部を変性溶液に浸し、ホモジナイザーで破碎して抽出液10mlを得た。等量

のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（容量混合比 25 : 24 : 1）溶液を加えて混和し、遠心分離して得た上層部分に、0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム（pH 4.5）、抽出液と等量の酸性フェノール：クロロホルム溶液の順に添加・攪拌し、遠心分離して上層部分を  
5 回収した。これに、イソプロパノール液を加えて -20℃ で 1 時間保持し、遠心して得られた沈殿物を、70% (v/v) エタノール水溶液で洗浄・乾燥後、300  $\mu$ l の 0.1 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液で溶解した。70℃ で 10 分間熱処理後、150  $\mu$ l の 7.5 M 塩化リチウムと 50 mM EDTA を含む溶液を添加し、-20℃  
10 で 1 時間保持した。遠心後の沈殿物は、70% (v/v) エタノール水溶液で洗浄・乾燥後、0.5 mM EDTA を含むジエチルピロカーボネート（DEPC）処理水に溶解し、186  $\mu$ g の全 RNA を調製した。

#### 実験 9-2 : RJP70 をコードする cDNA のクローニング

15 実験 9-1 で得た全 RNA（1  $\mu$ g /  $\mu$ l）を 5  $\mu$ l、0.2  $\mu$ g /  $\mu$ l のランダムヘキサマーを 5  $\mu$ l、及び DEPC 処理水 50  $\mu$ l を 0.5 ml 容チューブに入れ、サーマルサイクラー（パーキンエルマー社製、商品名『DNA サーマルサイクラー 480』）を用いて、70℃ で 5 分間加熱後、4℃ に急冷させた。これに、5 倍濃度 RT-PCR 反応液を 2  
20 0  $\mu$ l、100 mM ジチオトレイトールを 10  $\mu$ l、25 mM dNTP を 5  $\mu$ l、200 U /  $\mu$ l のモロニー Maus 白血病ウイルス（M-MLV）逆転写酵素（インビトロジェン社製）を 5  $\mu$ l 加え、25℃ で 10 分間、42℃ で 30 分間、99℃ で 5 分間保持して逆転写反応を行い、第 1 スtrand cDNA を含む水溶液を得た。次いで、ジェンバンクデータ  
25 ーベースより入手した MRJP3 の cDNA 塩基配列の情報に基づき合成した、配列表における配列番号 9 の塩基配列を有するセンスプライ

マーと、配列表における配列番号 10 の塩基配列を有するアンチセンスプライマーを用いて常法に従い、PCR による増幅を行った。逆転写反応産物 2  $\mu$ l に、宝酒造社製の 10 倍濃度 Ex Taq 反応液を 5  $\mu$ l、Ex Taq ポリメラーゼ (2.5 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l、2.5 mM dNTP を 4  $\mu$ l、上記センスプライマー (100 ng/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l、上記アンチセンスプライマー (100 ng/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加え、滅菌水で 50  $\mu$ l とした。反応は、94  $^{\circ}$ C で 30 秒間、61  $^{\circ}$ C で 30 秒間、72  $^{\circ}$ C で 3 分間の順で 35 サイクル行った。PCR 産物を 0.9% アガロースゲル電気泳動に供したところ、約 1,600 bp 付近に増幅された DNA 断片のバンドが検出された。常法により、この増幅 DNA 断片をゲルから抽出し、回収した。この一部を、クローニングキット (ストラタジーン社製、『pCR-Script SK(+)-Cloning Kit』) を用い、添付の説明書に従って操作して、プラスミドベクター『pCR-Script Cam SK(+)]』との連結反応に供した。

連結反応産物の一部で、大腸菌コンピテントセル (ストラタジーン社製、『XL10-Gold Kan』) を、添付の説明書に従って操作し、形質転換した。形質転換した大腸菌は、30  $\mu$ g/ml クロラムフェニコールを含んだ LB (1% 塩化ナトリウム、1% トリプトン、0.5% 酵母エキス) - 2% 寒天平板培地に接種し、37  $^{\circ}$ C にて 16 時間培養した。

出現したコロニーを、30  $\mu$ g/ml クロラムフェニコールを含む LB 液体培地に接種し、37  $^{\circ}$ C で 16 時間振とう培養し、常法により、菌体より組換え DNA を調製した。通常のジデオキシ法により、DNA シーケンサー (アプライドバイオシステムズ社製、モデル 373A) を用いて塩基配列解析を行ったところ、RJP70c DNA は配列表における配列番号 5 の塩基配列を有していた。なお、配列表における配列番号 3 のアミノ酸配列は、配列表における配列番号 5 の塩基配列に並記したア

ミノ酸配列から分泌シグナル配列に相当する20アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を除いた、成熟型蛋白質のアミノ酸配列である。

#### 実験9-3：RJP55をコードするcDNAのクローニング

5 ジェンバンクデータベースより入手したMRJP1のcDNA塩基配列の情報に基づき合成した、配列表における配列番号11の塩基配列を有するセンスプライマーと、配列表における配列番号12の塩基配列を有するアンチセンスプライマーを用い、PCR反応を94℃で30秒間、46℃で30秒間、72℃で3分間の順で5サイクル、引き続き、94℃  
10 で30秒間、61℃で30秒間、72℃で3分間の順で35サイクル行った以外は、実験9-2と同様にしてRJP55cDNAをクローニングし、塩基配列解析を行った。クローニングしたRJP55cDNAは配列表における配列番号6の塩基配列を有していた。なお、配列表における配列番号4のアミノ酸配列は、配列表における配列番号6の塩基配  
15 列に並記したアミノ酸配列から開始コドンATGがコードするメチオニンを1残基除いた、成熟型蛋白質のアミノ酸配列である。

#### 実験10：組換えDNA技術による抗アレルギー蛋白質の生産

##### 実験10-1：RJP70組換えバキュロウィルスの調製

20 実験9-2で得たRJP70の完全長cDNAについて、BDファーマインジェン社製の『BDバキュロゴールド・トランスフェクション・キット(BD BaculoGold Transfection Kit)』を用い、昆虫細胞での蛋白質発現用組換えバキュロウィルスを調製した。  
実験9-2で得られた組換えDNAは、制限酵素NotI及びBamHI  
25 Iにて消化後、0.9%(w/v)アガロース電気泳動を行い、1,600bp付近のRJP70cDNA断片をゲルより抽出・精製した。これ

を、宝酒造社製の『ライゲーション・キット バージョン 2』を用いて、バキュロウィルス・トランスファーベクター『pVL1393』のポリヘドリン・プロモーター下流の BamHI - NotI 部位に連結させた。連結反応産物の一部で、宝酒造社製の大腸菌コンピテントセル『JM109』株を、添付の説明書に従って操作し、形質転換した。形質転換した大腸菌は、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンを含んだ LB - 2% 寒天平板培地に接種し、 $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間培養した。出現したコロニーを、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリン含有 LB 液体培地に接種し、 $37^\circ\text{C}$  で 16 時間振とう培養後、常法により、菌体から組換え DNA を調製し、RJP70cDNA の挿入を確認後、RJP70 組換えベクター『pVL1393-rjp70-4』を作製した。次に、キットの添付説明書の操作方法に従い、Sf9 昆虫細胞 (ATCC CRL-1711、ヨトウガ由来) を用いて、組換えウィルスの作製を行った。Sf9 は、10% (v/v) FCS 添加の TC100 培地 (インビトロジェン社製) を用い、6 穴プレートに  $1 \times 10^6$  個/ウェルで播種し、10 分間付着させ、上清除去後、0.5 ml のトランスフェクション・バッファー A 液 (10% (v/v) FCS 含有 グレース培地) に置換した。これに、あらかじめ  $1.5 \mu\text{g}$  の『pVL1393-rjp70-4』と  $0.25 \mu\text{g}$  の『BD バキュロゴールド・バキュロウィルス DNA』を混合して 5 分間反応させた後に、0.5 ml のトランスフェクション・バッファー B 液 ( $125 \text{ mM}$  塩化カルシウム、 $140 \text{ mM}$  塩化ナトリウム、 $25 \text{ mM}$  HEPES, pH 7.1) を添加した混合液を、0.5 ml/ウェルで添加し、 $27^\circ\text{C}$  で 4 時間感染させた。対照として、野性型バキュロウィルスを含むバッファー B 液を同様の方法で 0.5 ml/ウェルで別途 Sf9 昆虫細胞に添加し、感染させた。次に、各ウェルを 10% (v/v) FCS 添加 TC-100 培地で 1 回洗浄後、同培地 2 ml を添加し、更に 2

7℃で6日間培養を行った。各培養液を1,000rpmで5分間遠心分離して上清を回収し、RJP70組換えバキュロウィルス調製液あるいはウィルスコントロール液とした。更にそれぞれのウィルスの力価を上げるため、Sf9細胞  $1 \times 10^7$  個に上記の調製液を50乃至200  
5  $\mu$ l 添加し、27℃で1週間感染させ、遠心分離して得た上清を、蛋白質発現用のRJP70組換えウィルス液及びウィルスコントロール（野生型ウィルス）液として調製した。

#### 実験10-2：RJP70組換え蛋白質の調製

10 蛋白質発現用細胞として、昆虫細胞株（インビトロジェン社製、イラクサギンウワバ由来、『High Five』）を用いた。昆虫細胞株は、L-グルタミン（最終濃度  $1 \text{ mg/ml}$ ）を添加したエクスプレスファイブ無血清培地（インビトロジェン社製）を用いて  $1 \times 10^8$  個/ $10 \text{ ml}$  に調製し、実験10-1で得たRJP70組換えウィルス液を20  
15  $0 \mu$ l 添加し、10分毎に攪拌しながら1時間感染させた。次に、エクスプレスファイブ無血清培地を40ml 添加後、27℃で1週間培養を行った。培養上清は、15,000rpmで30分間遠心分離してウィルスを除去し、分画分子量30キロダルトンの限外ろ過膜（ミリポア社製、商品名『ウルトラフリー15 UFV2BTK10 <30000』）  
20 で遠心濃縮し、続いて『セファデックス（Sephadex）G-25M』ゲル充填カラム（アマシャムバイオサイエンス社製、商品名『PD-10』）を用いて1.5倍濃度のPBS（-）に交換し、アッセイに使用可能な組換えRJP70液を調製した（回収した培養上清の20倍濃縮液）。また、RJP70組換えウィルスの代わりにウィルスコントロール液を用いた以外は上記と同様に操作して、対照として用いる試料液を  
25 調製した。



# 実験 10-3 : 組換え RJP70 の サイトカイン 産生 抑制 活性

実験 2 で示した活性測定方法により、組換え RJP70 の IL-2 及び IL-4 産生抑制作用を調べた。実験 10-2 で得た組換え RJP70 液及び対照に、それぞれ 0.5 倍量の滅菌水を加えたものを原液として活性測定を行い、対照のサイトカイン産生量を 100% とした時の相対値を算出して、RJP70 の活性を評価した。結果を表 8 に示した。

表 8 :

試料	相対サイトカイン産生率(%)	
	IL-2	IL-4
対照 (ウイルスコントロール)	100	100
組換えRJP70 20 $\mu$ g/ml*	101	86
102 $\mu$ g/ml*	60	79
307 $\mu$ g/ml*	57	66
920 $\mu$ g/ml*	43	49

\* 数値はウイルス感染細胞の培養上清に含まれる総蛋白濃度を示す。

表 8 から明らかなように、組換え RJP70 液は、用量依存的に IL-2 及び IL-4 の産生を抑制した。このことは RJP70 蛋白質が抗アレルギー作用を有することを示している。

以下に、具体的な実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

## 実施例 1 : 抗アレルギー剤

市販の  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロースの含水結晶 (株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』) 8.5 質量部と、実験 3-2 の方法で精製し、実験 3-2 で物理化学的性質を明らかにしている RJP70 精製標品の凍結真

空乾燥品 1.5 質量部とを均一に混合し、粉碎機を用いて粉末にした。  
この粉末を 0.42 mm φメッシュの篩を通過したものを回収し、本発  
明の抗アレルギー剤を得た。実験 2 に準じて試験し、当該抗アレルギー  
剤がサイトカインの産生を抑制することを確認した後、常温で 10 日間  
5 保存して再度実験 2 に準じて試験し、安定してサイトカインの産生を抑  
制する抗アレルギー作用を示すことを確認した。

当該抗アレルギー剤を打錠機を用いて 1 錠あたり約 200 mg の錠剤  
に成形した。本品は、常温保存の後も安定して抗アレルギー作用を示す、  
簡便に利用できかつ著効を示す抗アレルギー剤である。本品は、まろや  
10 かな甘味を示すので、日常的に利用する健康食品としても有用である。

#### 実施例 2：抗アレルギー剤

以下の成分を以下の配合で均一に混合した後、実施例 1 に準じて操作  
して、粉末形態の本発明の抗アレルギー剤を調製した。なお、RJP7  
15 0 及び RJP55 に関しては実験 3-2 及び 3-4 の方法で精製し、実  
験 3-3 及び 3-5 で物理化学的性質を明らかにしている精製標品を凍  
結真空乾燥して得た蛋白質としての質量部で混合した。調製後、実験 2  
に準じて試験し、当該抗アレルギー剤が常温保存後も安定してサイトカ  
インの産生を抑制し、抗アレルギー作用を示すことを確認した。

20  $\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース（株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』）

7.7 質量部

RJP70 精製標品の凍結乾燥粉末

1.0 質量部

RJP55 精製標品の凍結乾燥粉末

0.4 質量部

糖転移ヘスペリジン（株式会社林原商事販売、商品名『 $\alpha$ Gヘスペリ  
25 ジンPS』）

4 質量部

プルラン（株式会社林原商事販売、商品名『プルランPF-20』）

## 0.5 質量部

この抗アレルギー剤を、打錠機を用いて1錠あたり約300mgの錠剤に成形した。本品は、常温保存の後も安定して抗アレルギー作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示す抗アレルギー剤である。本品は、ま  
5 ろやかな甘味を示すので、日常的に利用する健康食品としても有用である。

## 実施例3：抗アレルギー剤

以下の成分を以下の配合で均一に混合した後、実施例1に準じて操作  
10 して、粉末の形態の本発明の抗アレルギー剤を調製した。なお、部分精製ローヤルゼリーとしては、実験3-1の方法で『DEAE-5PW』ゲル（株式会社東ソー製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにて部分精製した活性蛋白質1画分を凍結真空乾燥して得た蛋白質としての質量部で混合した。調製後、実験2に準じて試験し、当該抗ア  
15 レルギー剤が常温保存後も安定してサイトカインの産生を抑制し、抗アレルギー作用を示すことを確認した。

無水結晶マルトース（株式会社林原商事販売、商品名『ファイントー  
ス』） 7.5 質量部

部分精製ローヤルゼリーの凍結乾燥粉末 1.5 質量部

20 マルチトール 0.8 質量部

レートリプトファン 0.2 質量部

本品は、常温保存の後も安定して抗アレルギー作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示す抗アレルギー剤である。本品は、まろやかな甘味を示すので、日常的に利用する健康食品としても有用である。

25

## 実施例4：健康飲料

無水結晶マルトース（（株）林原商事販売、商品名『ファイントース』）  
500質量部、実施例3の抗アレルギー剤100質量部、粉末卵黄190質量部、脱脂粉乳200質量部、塩化ナトリウム4.4質量部、塩化カリウム1.85質量部、硫酸マグネシウム4質量部、チアミン0.01質量部、アスコルビン酸ナトリウム0.1質量部、ビタミンEアセテート0.6質量部及びニコチン酸アミド0.04質量部からなる配合物を調製した。この配合物25質量部を精製水150質量部に均一に分散・溶解させ、150gずつ褐色ガラス瓶に封入した。

本品は、抗アレルギー作用を安定して示す上、栄養源が補足されているので、健康維持、成長促進、アレルギーの予防、症状の緩和、治療の促進などを目的とする健康飲料として有利に利用できる。なお、本品は、ヒトのみならず、家畜などの動物のための経口摂取又は経管投与用組成物としても有利に利用できる。

#### 15 実施例5：チューインガム

ガムベース3質量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに無水結晶マルチトール（株式会社林原商事販売、商品名『結晶マビット』）2質量部とキシリトール2質量部及び実施例2で得た抗アレルギー剤4質量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合した。常法によってロールにより練り合わせている間に実験3-2の方法で得たRJP70を0.5質量部加え、更に練り合わせた後、成形、包装して製品を得た。

本品はテクスチャー、呈味、風味良好であり、抗アレルギー作用をも有するため、日常的に利用するチューインガムとして有利に利用できる。

#### 25 実施例6：皮膚外用クリーム

以下の成分を、以下の配合にしたがって、常法により加熱しつつ混合

した。

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリセリン 2.0 質量部

自己乳化型モノステアリン酸グリセリン 5.0 質量部

ベヘニン酸エイコサニル 1.0 質量部

5 流動パラフィン 1.9 質量部

トリオクタン酸トリメチロールプロパン 10.0 質量部

上記の混合物に、抗アレルギー剤を除く以下の成分を以下の配合にしたがって添加・混合し、30℃以下にまで冷却した後に、さらに抗アレルギー剤を以下の配合で加え、ホモジナイザーにより乳化して、皮膚外

10 用クリームを製造した。

1,3-ブチレングリコール 5.0 質量部

乳酸ナトリウム液 10.0 質量部

パラオキシ安息香酸メチル 0.1 質量部

モモ葉エキス 1.5 質量部

15 精製水 62.2 質量部

実施例1の方法で得た抗アレルギー剤粉末 1.0 質量部

本クリームは、優れた保湿性を示す上、アトピー性皮膚炎などのアレルギー症状を緩和するので、皮膚外用クリームとして有用である。

## 20 実施例7：液剤

生理食塩水に実験3-2の方法で精製し、実験3-3で物理化学的性質を明らかにしているRJP70精製標品を濃度0.1質量%になるよう溶解した後、溶液を常法にしたがって精密ろ過により滅菌して液剤を得た。

25 本品は花粉症などのアレルギー疾患を緩和・治療するための注射剤、点眼剤、点鼻剤などとして有用である。

## 実施例 8 : トローチ錠

以下の成分を以下の配合で均一に混合した後、実施例 1 に準じて操作して、粉末の形態の本発明の抗アレルギー剤を調製した。調製後、実験 2 に準じて試験し、当該抗アレルギー剤が常温保存後も安定してサイト

5 カインの産生を抑制し、抗アレルギー作用を示すことを確認した。

無水結晶マルトース（株式会社林原商事販売、商品名『ファイントース』） 30 質量部

澱粉 30 質量部

実験 3 - 2 の方法で得た R J P 7 0 精製標品の凍結乾燥粉末

10 10 質量部

結晶セルロース 19 質量部

ヒドロキシプロピルメチルセルロース 10 質量部

ステアリン酸マグネシウム 1 質量部

当該抗アレルギー剤を、打錠機を用いて直径 16 mm、厚さ 4 mm の

15 1 錠あたり約 1.0 g のトローチ剤に成形した。本品は、常温保存の後にも安定して抗アレルギー作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示すトローチ剤である。本品は、まるやかな甘味を示すので、アトピー性アレルギーの予防、症状の緩和、治療の促進などを目的として日常的に利用する経口抗アトピー用トローチ剤として有用である。

20

## 実施例 9 : 錠剤

無水結晶マルトース（株式会社林原商事販売、商品名『ファイントース』）9 質量部と、実験 2 の試験方法によりサイトカイン産生抑制活性が高レベルで認められた生ローヤルゼリー（ブラジル産）1 質量部とを均

25 一に混合し、この混合物を 25℃で一夜静置した後、粉碎機を用いて粉末にした。この粉末を 0.42 mm φメッシュの篩を通したものを回収

し、本発明の抗アレルギー剤を得た。

当該抗アレルギー剤を打錠機を用いて1錠あたり約300mgの錠剤に成形した。本品は、常温保存の後も安定して抗アレルギー作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示す抗アレルギー剤である。本品は、まろやかな甘味を示すので、アトピー性アレルギーの予防、症状の緩和、治療の促進などを目的として日常的に利用する経口抗アトピー用剤として有用である。

#### 産業上の利用の可能性

10 以上説明したように、本発明は、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーから採取される蛋白質、又は、それら蛋白質を含有するローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーが、ヒトを含む哺乳類に対して、顕著に抗体産生及びサイトカイン産生を抑制することにより抗アレルギー作用を示すという全く独自の知見に基づき、抗アレルギー作用を有する蛋白質  
15 又はそれらを含有するローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを用いた抗アレルギー剤としての用途を開発するものである。本発明の抗アレルギー剤は、重篤な副作用の懸念がないので、ヒトを含む哺乳類が簡便かつ快適に、アトピー性疾患をはじめとするアレルギー疾患、自己免疫疾患の諸症状の予防・緩和・治療のために利用することができる。また、  
20 以上のような特長を有する本発明の抗アレルギー剤は、飲食物、化粧品、医薬品としての形態で利用することも有利に実施できる。

本発明は、斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

## 請 求 の 範 囲

1. 有効成分として、配列表における番号番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質、又は、抗アレルギー作用を実質的に失わない範囲  
5 で、配列表における番号番号 3 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基が 1 個又は 2 個以上が欠失、置換、挿入、付加された蛋白質を含んでなる抗アレルギー剤。
2. 有効成分として、配列表における番号番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質、又は、抗アレルギー作用を実質的に失わない範囲  
10 で、配列表における番号番号 4 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基が 1 個又は 2 個以上が欠失、置換、挿入、付加された蛋白質を含んでなる抗アレルギー剤。
3. ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤。
- 15 4. 請求の範囲第 3 項に記載の精製ローヤルゼリーが、ローヤルゼリー水溶性蛋白質画分であることを特徴とする抗アレルギー剤。
5. 2 m g / m l の蛋白質濃度の試料を用いた本明細書記載のサイトカイン産生抑制試験において、蛋白質無添加の場合に対し、インターロイキン 2 の相対産生量を 8 0 % 以下、又は、インターロイキン 4 の相対  
20 産生量を 6 0 % 以下まで低下させることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の抗アレルギー剤。
6. 配列表における番号番号 3 で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質、又は、抗アレルギー作用を実質的に失わない範囲で、配列表における番号番号 3 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基が 1 個又は 2 個以上が欠失、置換、挿入、付加された蛋白質を含んでなる組成物を用いる  
25 ことを特徴とするアレルギー抑制方法。



7. 配列表における配列番号4で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質、又は、抗アレルギー作用を実質的に失わない範囲で、配列表における番号番号4で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基が1個又は2個以上が欠失、置換、挿入、付加された蛋白質を含んでなる組成物を用いることを特徴とするアレルギー抑制方法。

8. 請求の範囲第6項又は第7項に記載の組成物が、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーであることを特徴とするアレルギー抑制方法。

9. 請求の範囲第8項に記載の精製ローヤルゼリーが、ローヤルゼリーの水溶性蛋白質画分であることを特徴とするアレルギー抑制方法。

10 10. 有効成分としての請求の範囲第6項又は第7項に記載の蛋白質を、1日あたり0.01mg乃至100mg/kg体重で摂取又は投与することを特徴とする請求の範囲第6項、第7項、第8項又は第9項に記載のアレルギー抑制方法。

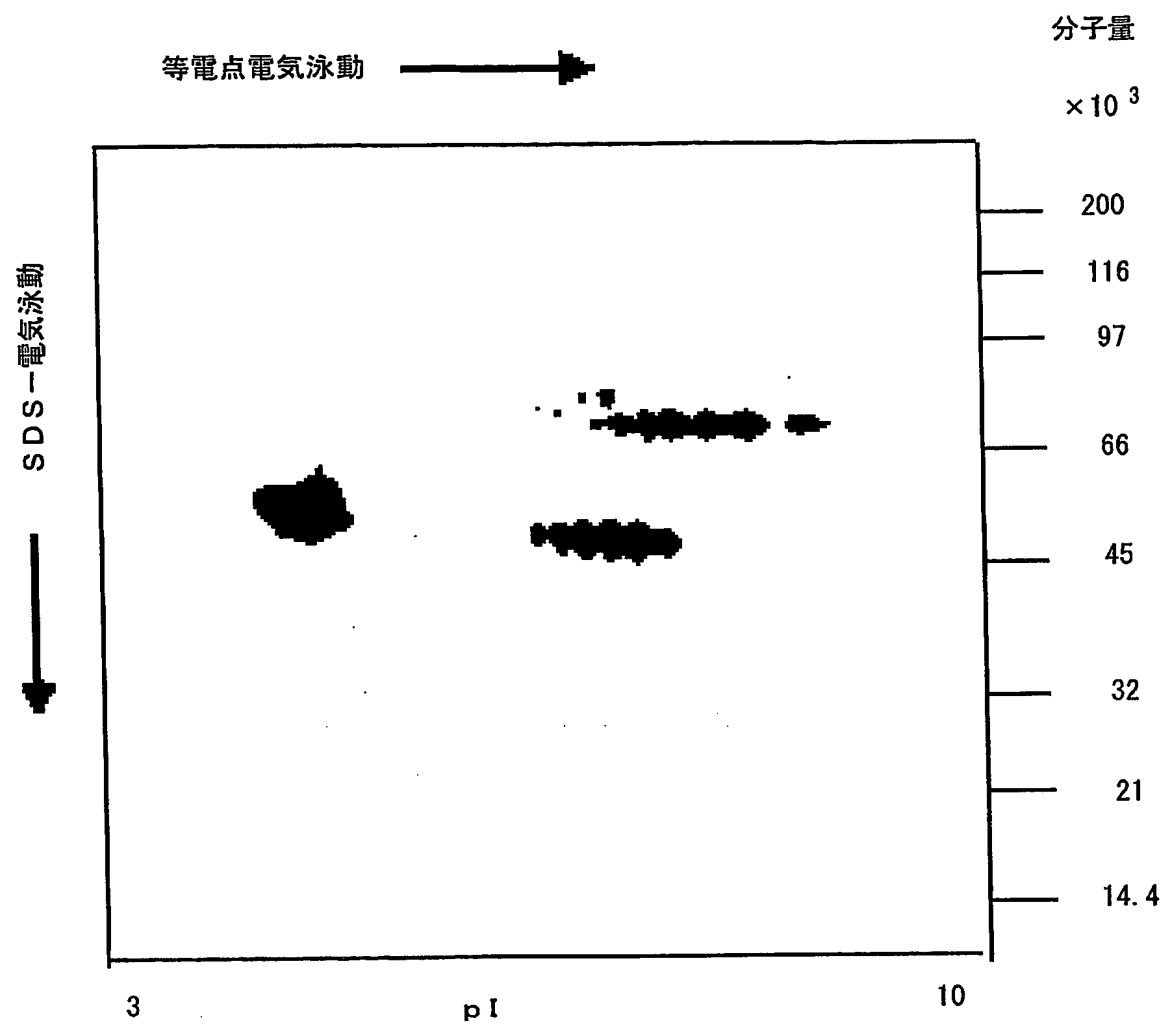
15 11. 請求の範囲第1項、第2項、第3項又は第4項に記載の抗アレルギー剤を含んでなる飲食物。

12. 請求の範囲第1項、第2項、第3項又は第4項に記載の抗アレルギー剤を含んでなる化粧品。

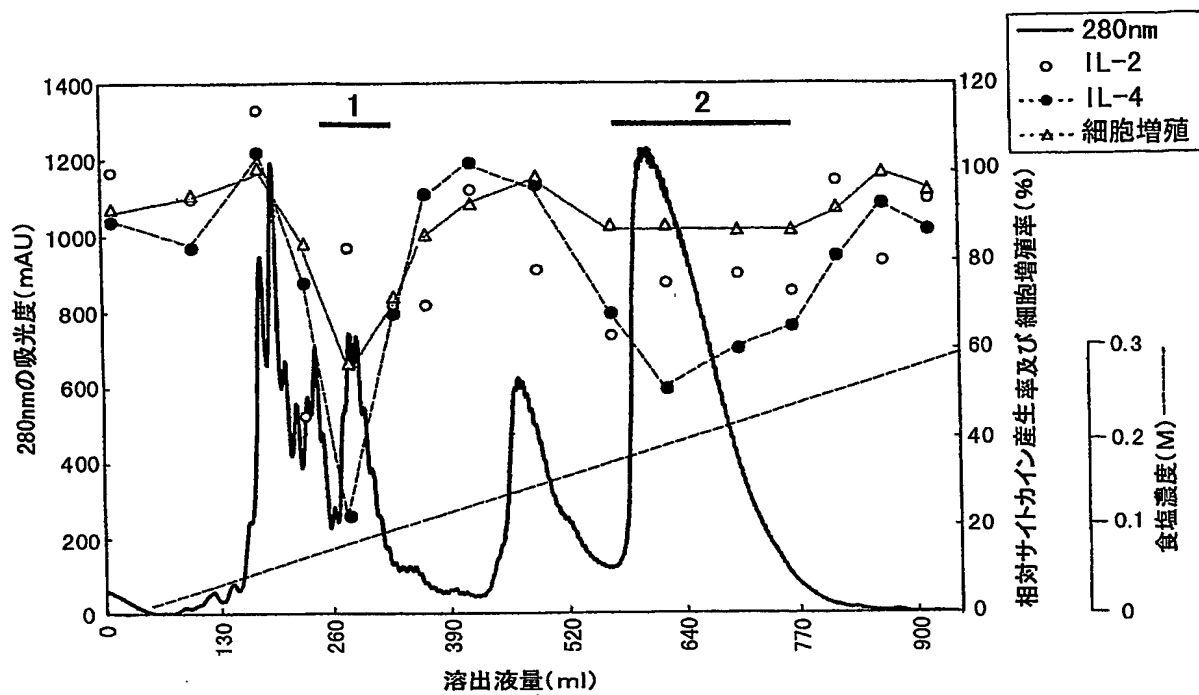
13. 請求の範囲第1項、第2項、第3項又は第4項に記載の抗アレルギー剤を含んでなる医薬品。

1/5

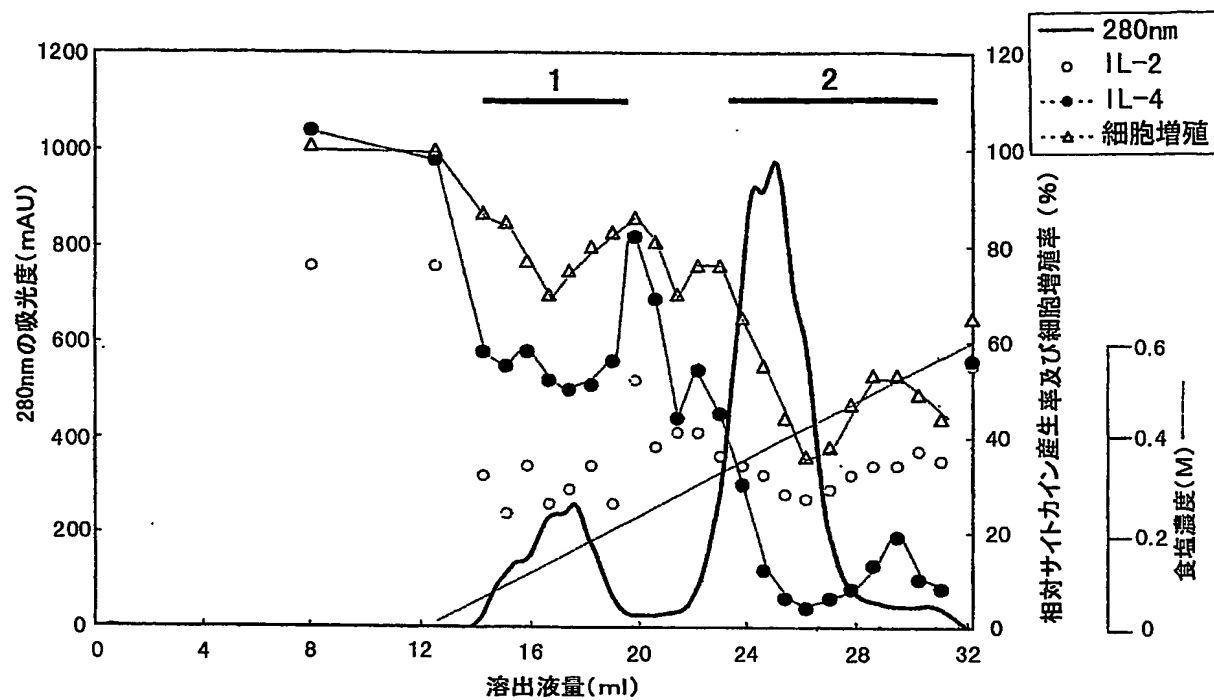
第 1 図



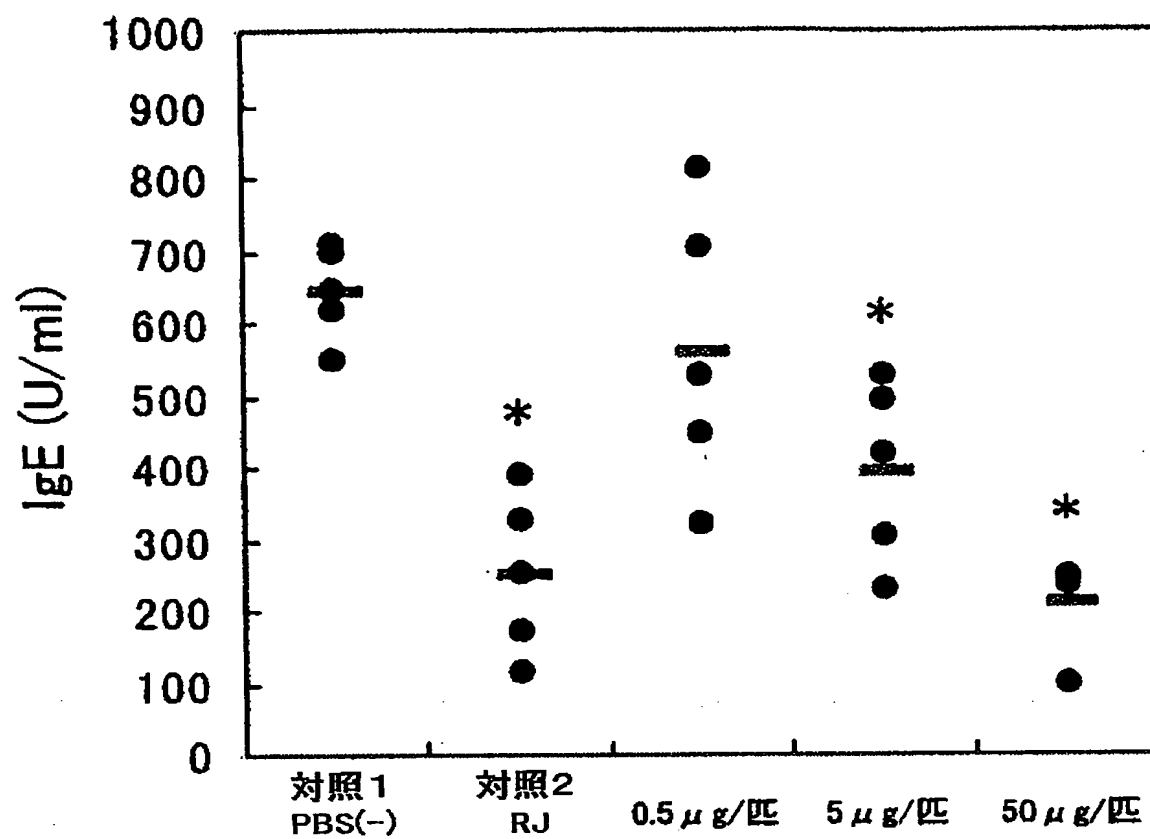
第 2 図



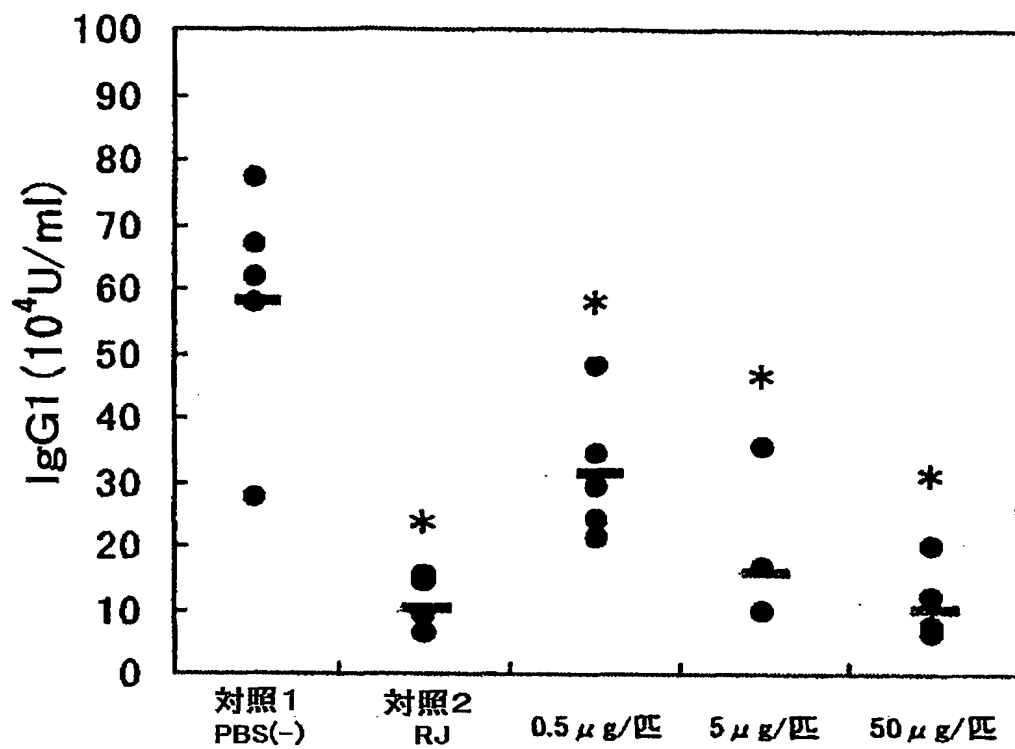
第 3 図



第 4 図



第 5 図



## SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Anti-allergic agent

<130> W0961

<160> 12

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 1

Ala Ala Val Asn His Gln Arg Lys Ser Ala  
1 5 10

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 2

Asn Ile Leu Arg Gly Glu Ser Leu Asn Lys Ser Leu Pro Ile Leu His  
1 5 10 15  
Glu Trp Lys Phe Phe Asp Tyr Asp Phe  
20 25

<210> 3

<211> 524

<212> PRT

<213> Apis mellifera

<400> 3

Ala Ala Val Asn His Gln Arg Lys Ser Ala Asn Asn Leu Ala His Ser  
1 5 10 15  
Met Lys Val Ile Tyr Glu Trp Lys His Ile Asp Phe Asp Phe Gly Ser  
20 25 30  
Asp Glu Arg Arg Asp Ala Ala Ile Lys Ser Gly Glu Phe Asp His Thr  
35 40 45  
Lys Asn Tyr Pro Phe Asp Val Asp Arg Trp Arg Asp Lys Thr Phe Val

2/19

50		55		60
Thr Ile Glu Arg Asn Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Val Thr				
65		70		75
Asn Lys Lys Gly Lys Gly Gly Pro Leu Leu Arg Pro Tyr Pro Asp Trp				80
	85		90	95
Ser Phe Ala Lys Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Phe Lys				
	100		105	110
Ile Ala Val Asp Lys Phe Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu				
	115		120	125
Val Asn Asn Asn Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp				
	130		135	140
Leu Lys Thr Ser Lys Leu Val Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asn Ile				
145		150		155
Ala Val Asn Ala Thr Thr Gly Met Gly Glu Leu Val Ser Leu Ala Val				160
	165		170	175
Gln Ala Ile Asp Arg Thr Asn Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys				
	180		185	190
Gly Glu Gly Leu Ile Met Tyr Gln Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg				
	195		200	205
Leu Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Arg Tyr Thr Lys Leu Thr				
	210		215	220
Val Ala Gly Glu Ser Phe Thr Val Lys Asn Gly Ile Cys Gly Ile Ala				
225		230		235
Leu Ser Pro Val Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Leu Ser Ser His				
	245		250	255
Gly Leu Tyr Tyr Val Asp Thr Glu Gln Phe Arg Asn Pro Gln Tyr Glu				
	260		265	270
Glu Asn Asn Val Gln Tyr Glu Gly Ser Gln Asp Ile Leu Asn Thr Gln				
	275		280	285
Ser Phe Gly Lys Val Val Ser Lys Asn Gly Val Leu Phe Leu Gly Leu				
	290		295	300
Val Gly Asn Ser Gly Ile Ala Cys Val Asn Glu His Gln Val Leu Gln				
305		310		315
Arg Glu Ser Phe Asp Val Val Ala Gln Asn Glu Glu Thr Leu Gln Met				
	325		330	335
Ile Val Ser Met Lys Ile Met Glu Asn Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile				
	340		345	350
Asn Asp Pro Glu Gly Asn Glu Tyr Met Leu Ala Leu Ser Asn Arg Met				
	355		360	365
Gln Lys Ile Ile Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asn Asp Val Asn Phe Arg				



3/19

370	375	380
Ile Leu Gly Ala Asn Val Asp Asp Leu Met Arg Asn Thr Arg Cys Gly		
385	390	395
Arg Tyr His Asn Gln Asn Ala Gly Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn		400
405	410	415
Ala Asp Asn Gln Asn Ala Asn Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn Ala		
420	425	430
Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Arg Gln Asn Asp Asn		
435	440	445
Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg		
450	455	460
Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Gly Asn Lys Gln		
465	470	475
Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Arg Asn		
485	490	495
Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Gln Asn Asn Gln Asn Asp Asn Asn Arg		
500	505	510
Asn Asp Asn Gln Val His His Ser Ser Lys Leu His		
515	520	

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 413

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Apis mellifera

&lt;400&gt; 4

Asn Ile Leu Arg Gly Glu Ser Leu Asn Lys Ser Leu Pro Ile Leu His		
1	5	10
Glu Trp Lys Phe Phe Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg Arg Gln		
20	25	30
Asp Ala Ile Leu Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr Lys Asn Asn Tyr Pro Ser		
35	40	45
Asp Ile Asp Gln Trp His Asp Lys Ile Phe Val Thr Met Leu Arg Tyr		
50	55	60
Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Ser Lys Lys Val Gly Asp		
65	70	75
Gly Gly Pro Leu Leu Gln Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys Tyr		
85	90	95
Asp Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys Leu Ala Ile Asp Lys		
100	105	110
Cys Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn Thr Gln		

4/19

115	120	125
Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp Leu Thr Thr Ser Gln		
130	135	140
Leu Leu Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asp Val Ala Val Asn Ala Thr		
145	150	155
Thr Gly Lys Gly Arg Leu Ser Ser Leu Ala Val Gln Ser Leu Asp Cys		160
	165	170
Asn Thr Asn Ser Asp Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys Gly Glu		175
	180	185
Gly Leu Ile Val Tyr His Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg Leu Thr		190
	195	200
Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Lys Phe Thr Lys Met Thr Ile Asp		205
	210	215
Gly Glu Ser Tyr Thr Ala Gln Asp Gly Ile Ser Gly Met Ala Leu Ser		220
225	230	235
Pro Met Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Val Ala Ser Thr Ser Leu		
	245	250
Tyr Tyr Val Asn Thr Glu Gln Phe Arg Thr Ser Asp Tyr Gln Gln Asn		255
	260	265
Asp Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn Ile Leu Asp Thr Gln Ser Ser		270
	275	280
Ala Lys Val Val Ser Lys Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val Gly		285
	290	295
Asp Ser Ala Leu Gly Cys Trp Asn Glu His Arg Thr Leu Glu Arg His		300
305	310	315
Asn Ile Arg Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr Leu Gln Met Ile Ala		
	325	330
Ser Met Lys Ile Lys Glu Ala Xaa Pro His Val Pro Ile Phe Asp Arg		335
	340	345
Tyr Ile Asn Arg Glu Tyr Ile Leu Val Leu Ser Asn Lys Met Gln Lys		350
	355	360
Met Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg Ile Met		365
	370	375
Asn Ala Asn Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg Cys Glu Asn Pro		380
385	390	395
Asp Asn Asp Arg Thr Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu		400
	405	410

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1635

5/19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Apis mellifera

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1635)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (61)..(1632)

&lt;400&gt; 5

atg aca aag tgg ttg ttg ctg gtg gtg tgc ctt ggt ata gct tgt caa 48  
 Met Thr Lys Trp Leu Leu Leu Val Val Cys Leu Gly Ile Ala Cys Gln  
 -20 -15 -10 -5

gat gta aca agc gca gct gtg aat cat caa aga aaa tct gca aat aat 96  
 Asp Val Thr Ser Ala Ala Val Asn His Gln Arg Lys Ser Ala Asn Asn  
 1 5 10

ttg gca cat tct atg aaa gtg atc tac gaa tgg aaa cac att gat ttt 144  
 Leu Ala His Ser Met Lys Val Ile Tyr Glu Trp Lys His Ile Asp Phe  
 15 20 25

gat ttc ggt agc gat gaa aga aga gat gct gcg att aaa tct ggc gaa 192  
 Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg Arg Asp Ala Ala Ile Lys Ser Gly Glu  
 30 35 40

ttt gat cac aca aaa aat tat cct ttc gat gtg gac aga tgg cgt gat 240  
 Phe Asp His Thr Lys Asn Tyr Pro Phe Asp Val Asp Arg Trp Arg Asp  
 45 50 55 60

aag aca ttt gtc acc ata gaa agg aac aat ggt gta cct tct tct ttg 288  
 Lys Thr Phe Val Thr Ile Glu Arg Asn Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu  
 65 70 75

aac gtg gta act aat aaa aag ggc aaa ggt gga cct ctt cta cga cca 336  
 Asn Val Val Thr Asn Lys Lys Gly Lys Gly Gly Pro Leu Leu Arg Pro  
 80 85 90

tat cct gat tgg tcg ttt gcc aaa tac gaa gat tgc tct gga att gig 384  
 Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Ile Val  
 95 100 105

6/19

agc gct ttc aaa att gcg gtc gac aaa ttt gac aga tta tgg gtt ctg 432  
 Ser Ala Phe Lys Ile Ala Val Asp Lys Phe Asp Arg Leu Trp Val Leu  
 110 115 120

gac tca ggt ctt gtc aat aat aat caa cct atg tgc tct cca aaa ttg 480  
 Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn Asn Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu  
 125 130 135 140

tta acc ttt gat ctg aaa acc tca aaa ttg gtt aag caa gtc gag ata 528  
 Leu Thr Phe Asp Leu Lys Thr Ser Lys Leu Val Lys Gln Val Glu Ile  
 145 150 155

cca cat aat att gcc gta aac gcc acc aca gga atg gga gaa tta gtt 576  
 Pro His Asn Ile Ala Val Asn Ala Thr Thr Gly Met Gly Glu Leu Val  
 160 165 170

tca cta gct gtt caa gct ata gat cgt acg aat act atg gtg tac ata 624  
 Ser Leu Ala Val Gln Ala Ile Asp Arg Thr Asn Thr Met Val Tyr Ile  
 175 180 185

gca gac gaa aaa ggc gaa ggt tta atc atg tat caa aac tcc gac gat 672  
 Ala Asp Glu Lys Gly Glu Gly Leu Ile Met Tyr Gln Asn Ser Asp Asp  
 190 195 200

tcc ttc cat cga ttg act tcc aat act ttc gat tac gat ccc aga tat 720  
 Ser Phe His Arg Leu Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Arg Tyr  
 205 210 215 220

acc aaa ttg aca gtc gct gga gaa agt ttc aca gtg aaa aat gga att 768  
 Thr Lys Leu Thr Val Ala Gly Glu Ser Phe Thr Val Lys Asn Gly Ile  
 225 230 235

tgt gga att gca ctt agt ccc gtg acg aac aat cit tat tac agc cct 816  
 Cys Gly Ile Ala Leu Ser Pro Val Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro  
 240 245 250

ctc tct tct cac ggt ttg tat tat gtt gat acg gaa caa ttc agg aat 864  
 Leu Ser Ser His Gly Leu Tyr Tyr Val Asp Thr Glu Gln Phe Arg Asn  
 255 260 265

7/19

cca caa tat gaa gaa aat aac gtg caa tat gaa gga tct caa gat att 912  
Pro Gln Tyr Glu Glu Asn Asn Val Gln Tyr Glu Gly Ser Gln Asp Ile  
270 275 280

ttg aac act caa tca ttc ggt aaa gta gta tgc aaa aat ggc gtc ctt 960  
Leu Asn Thr Gln Ser Phe Gly Lys Val Val Ser Lys Asn Gly Val Leu  
285 290 295 300

ttc ttg gga ctc gtg ggt aat tca ggt att gcc tgc gtg aat gaa cat 1008  
Phe Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Gly Ile Ala Cys Val Asn Glu His  
305 310 315

caa gta ctt cag aga gaa agt ttt gat gtt gtc gct cag aat gaa gag 1056  
Gln Val Leu Gln Arg Glu Ser Phe Asp Val Val Ala Gln Asn Glu Glu  
320 325 330

aca ctt caa atg atc gtt agt atg aaa atc atg gaa aat ctt cca caa 1104  
Thr Leu Gln Met Ile Val Ser Met Lys Ile Met Glu Asn Leu Pro Gln  
335 340 345

tcc ggc aga att aat gat cct gaa ggc aat gaa tat atg ttg gct ttg 1152  
Ser Gly Arg Ile Asn Asp Pro Glu Gly Asn Glu Tyr Met Leu Ala Leu  
350 355 360

agt aac aga atg caa aaa ata ata aac aat gat ttt aat ttc aac gac 1200  
Ser Asn Arg Met Gln Lys Ile Ile Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asn Asp  
365 370 375 380

gta aat ttc cga att ttg ggt gcg aat gta gat gac tta atg aga aac 1248  
Val Asn Phe Arg Ile Leu Gly Ala Asn Val Asp Asp Leu Met Arg Asn  
385 390 395

act cgt tgc gga aga tat cac aat cag aat gct ggc aat cag aat gct 1296  
Thr Arg Cys Gly Arg Tyr His Asn Gln Asn Ala Gly Asn Gln Asn Ala  
400 405 410

gac aat cag aat gct gac aat cag aat gct aac aat cag aat gct gat 1344  
Asp Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn Ala Asn Asn Gln Asn Ala Asp  
415 420 425

8/19

aat cag aat gct aac aaa caa aat ggt aat aga caa aat gat aac aga 1392  
Asn Gln Asn Ala Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Arg  
430 435 440

cag aat gat aac aag caa aat ggt aac aga cag aat gat aac aag caa 1440  
Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln  
445 450 455 460

aat ggt aac aga cag aat gat aac aag caa aat ggt aac aga caa aat 1488  
Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn  
465 470 475

ggt aac aaa cag aat gat aac aag caa aat ggt aac aga cag aat gat 1536  
Gly Asn Lys Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp  
480 485 490

aac aag agg aat ggt aac agg caa aat gat aat caa aat aat cag aat 1584  
Asn Lys Arg Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Gln Asn Asn Gln Asn  
495 500 505

gat aat aat cga aat gat aat caa gtt cat cat tct tca aaa tta cat 1632  
Asp Asn Asn Arg Asn Asp Asn Gln Val His His Ser Ser Lys Leu His  
510 515 520

taa 1635

525

<210> 6

<211> 1245

<212> DNA

<213> Apis mellifera

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1245)

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (4)..(1242)

<400> 6

9/19

atg aac att ctt cga gga gag tct tta aac aaa tca tta ccc atc ctt 48

Met Asn Ile Leu Arg Gly Glu Ser Leu Asn Lys Ser Leu Pro Ile Leu

-1 1 5 10 15

cac gaa tgg aaa ttc ttt gat tat gat ttc ggt agc gat gaa aga aga 96

His Glu Trp Lys Phe Phe Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg Arg

20 25 30

caa gat gca att cta tct ggc gaa tac gac tac aag aat aat tat cca 144

Gln Asp Ala Ile Leu Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr Lys Asn Asn Tyr Pro

35 40 45

tcc gac att gac caa tgg cat gat aag att ttt gtc acc atg ctg aga 192

Ser Asp Ile Asp Gln Trp His Asp Lys Ile Phe Val Thr Met Leu Arg

50 55 60

tac aat ggc gta cct tcc tct ttg aac gtg ata tct aaa aag gtc ggt 240

Tyr Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Ser Lys Lys Val Gly

65 70 75

gat ggt ggt cct ctt cta caa cct tat ccc gat tgg tcg ttt gct aaa 288

Asp Gly Gly Pro Leu Leu Gln Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys

80 85 90 95

tat gac gat tgc tct gga atc gtg agc gcc tca aaa ctt gcg atc gac 336

Tyr Asp Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys Leu Ala Ile Asp

100 105 110

aaa tgc gac aga ttg tgg gtt ctg gac tca ggt ctt gtc aat aat act 384

Lys Cys Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn Thr

115 120 125

caa ccc atg tgt tct cca aaa ctg ctg acc ttt gat ctg act acc tcg 432

Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp Leu Thr Thr Ser

130 135 140

caa ttg ctg aag caa gtt gaa ata cca cat gat gtt gcc gta aat gcc 480

Gln Leu Leu Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asp Val Ala Val Asn Ala

145 150 155

10/19

act aca gga aag gga aga tta tca tct cta gct gtt caa tct tta gat 528  
Thr Thr Gly Lys Gly Arg Leu Ser Ser Leu Ala Val Gln Ser Leu Asp  
160 165 170 175

tgc aat aca aat agc gat act atg gtg tac ata gca gac gag aaa ggt 576  
Cys Asn Thr Asn Ser Asp Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys Gly  
180 185 190

gaa ggt tta atc gtg tat cat aat tct gat gat tcc ttc cat cga ttg 624  
Glu Gly Leu Ile Val Tyr His Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg Leu  
195 200 205

act tcc aac act ttc gat tac gat cct aaa ttt acc aaa atg acg atc 672  
Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Lys Phe Thr Lys Met Thr Ile  
210 215 220

gat gga gaa agt tac aca gcc caa gat gga att tct gga atg gct ctt 720  
Asp Gly Glu Ser Tyr Thr Ala Gln Asp Gly Ile Ser Gly Met Ala Leu  
225 230 235

agt ccc atg act aac aat ctc tat tac agt cct gta gct tcc acc agt 768  
Ser Pro Met Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Val Ala Ser Thr Ser  
240 245 250 255

ttg tat tat gtt aac acg gaa caa ttc aga aca tcc gat tat caa cag 816  
Leu Tyr Tyr Val Asn Thr Glu Gln Phe Arg Thr Ser Asp Tyr Gln Gln  
260 265 270

aat gac ata cat tac gaa gga gtc caa aat att ttg gat acc caa tcg 864  
Asn Asp Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn Ile Leu Asp Thr Gln Ser  
275 280 285

tcc gct aaa gta gta tca aag agt ggc gtt ctc ttc ttc gga ttg gtg 912  
Ser Ala Lys Val Val Ser Lys Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val  
290 295 300

ggc gat tca gct ctt ggc tgc tgg aac gaa cat cga aca ctt gaa aga 960  
Gly Asp Ser Ala Leu Gly Cys Trp Asn Glu His Arg Thr Leu Glu Arg  
305 310 315



11/19

cac aat atc cgt acc gtc gct caa agt gat gag act ctt caa atg atc 1008  
His Asn Ile Arg Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr Leu Gln Met Ile  
320 325 330 335

gct agc atg aag att aag gaa gct ctt cca cac gtc cct ata ttc gat 1056  
Ala Ser Met Lys Ile Lys Glu Ala Leu Pro His Val Pro Ile Phe Asp  
340 345 350

agg tat ata aac cgt gaa tac ata ttg gtt tta agt aac aaa atg caa 1104  
Arg Tyr Ile Asn Arg Glu Tyr Ile Leu Val Leu Ser Asn Lys Met Gln  
355 360 365

aaa atg gtc aat aat gac ttc aac ttc gac gat gtt aac ttc aga att 1152  
Lys Met Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg Ile  
370 375 380

atg aac gcg aat gta aac gaa ttg ata ttg aac act cgt tgc gaa aat 1200  
Met Asn Ala Asn Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg Cys Glu Asn  
385 390 395

ccc gat aat gat cga aca cct ttc aaa att tca atc cat ttg taa 1245  
Pro Asp Asn Asp Arg Thr Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu  
400 405 410

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1830

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Apis mellifera

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (35)..(1669)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (35)..(94)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (95)..(1666)

&lt;400&gt; 7

gtcaattgga aaatatctgt attatcctag aaaa atg aca aag tgg ttg ttg ctg 55  
Met Thr Lys Trp Leu Leu Leu

12/19

-20

-15

gtg gtg tgc ctt ggt ata gct tgt caa gat gta aca agc gca gct gtg 103  
 Val Val Cys Leu Gly Ile Ala Cys Gln Asp Val Thr Ser Ala Ala Val  
           -10                          -5                          1

aat cat caa aga aaa tct gca aat aat ttg gca cat tct atg aaa gtg 151  
 Asn His Gln Arg Lys Ser Ala Asn Asn Leu Ala His Ser Met Lys Val  
           5                          10                          15

atc tac gaa tgg aaa cac att gat ttt gat ttc ggt agc gat gaa aga 199  
 Ile Tyr Glu Trp Lys His Ile Asp Phe Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg  
           20                          25                          30                          35

aga gat gct gcg att aaa tct ggc gaa ttt gat cac aca aaa aat tat 247  
 Arg Asp Ala Ala Ile Lys Ser Gly Glu Phe Asp His Thr Lys Asn Tyr  
                           40                          45                          50

cct ttc gat gtg gac aga tgg cgt gat aag aca ttt gtc acc ata gaa 295  
 Pro Phe Asp Val Asp Arg Trp Arg Asp Lys Thr Phe Val Thr Ile Glu  
                           55                          60                          65

agg aac aat ggt gta cct tct tct ttg aac gtg gta act aat aaa aag 343  
 Arg Asn Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Val Thr Asn Lys Lys  
           70                          75                          80

ggc aaa ggt gga cct ctt cta cga cca tat cct gat tgg tgc ttt gcc 391  
 Gly Lys Gly Gly Pro Leu Leu Arg Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala  
           85                          90                          95

aaa tac gaa gat tgc tct gga att gtg agc gct ttc aaa att gcg gtc 439  
 Lys Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Phe Lys Ile Ala Val  
  100                          105                          110                          115

gac aaa ttt gac aga tta tgg gtt ctg gac tca ggt ctt gtc aat aat 487  
 Asp Lys Phe Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn  
                           120                          125                          130

aat caa cct atg tgc tct cca aaa ttg tta acc ttt gat ctg aaa acc 535  
 Asn Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp Leu Lys Thr

13/19

135

140

145

tca aaa ttg gtt aag caa gtc gag ata cca cat aat att gcc gia aac 583

Ser Lys Leu Val Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asn Ile Ala Val Asn

150

155

160

gcc acc aca gga atg gga gaa tta gtt tca cta gct gtt caa gct aia 631

Ala Thr Thr Gly Met Gly Glu Leu Val Ser Leu Ala Val Gln Ala Ile

165

170

175

gat cgt acg aat act atg gtg tac ata gca gac gaa aaa ggc gaa ggt 679

Asp Arg Thr Asn Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys Gly Glu Gly

180

185

190

195

tta atc atg tat caa aac tcc gac gat tcc ttc cat cga ttg act tcc 727

Leu Ile Met Tyr Gln Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg Leu Thr Ser

200

205

210

aat act ttc gat tac gat ccc aga tat acc aaa ttg aca gtc gct gga 775

Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Arg Tyr Thr Lys Leu Thr Val Ala Gly

215

220

225

gaa agt ttc aca gtg aaa aat gga att tat gga att gca ctt agt ccc 823

Glu Ser Phe Thr Val Lys Asn Gly Ile Tyr Gly Ile Ala Leu Ser Pro

230

235

240

gtg acg aac aat ctt tat tac agc cct ctt ctt tct cac ggt ttg tat 871

Val Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Leu Leu Ser His Gly Leu Tyr

245

250

255

tat gtt gat acg gaa caa ttc agc aat cca caa tat gaa gaa aat aac 919

Tyr Val Asp Thr Glu Gln Phe Ser Asn Pro Gln Tyr Glu Glu Asn Asn

260

265

270

275

gtg caa tat gaa gga tct caa gat att ttg aac act caa tca ttc ggt 967

Val Gln Tyr Glu Gly Ser Gln Asp Ile Leu Asn Thr Gln Ser Phe Gly

280

285

290

aaa gia gia tgc aaa aat ggc gtc ctt ttc ttg gga ctc gtg ggt aat 1015

Lys Val Val Ser Lys Asn Gly Val Leu Phe Leu Gly Leu Val Gly Asn

14/19

295

300

305

tca ggt att gcc tgc gtg aat gaa cat caa gta ctt cag aga gaa agt 1063  
 Ser Gly Ile Ala Cys Val Asn Glu His Gln Val Leu Gln Arg Glu Ser  
 310 315 320

ttt gat gtt gtc gct cag aat gaa gag aca ctt caa atg atc gtt agt 1111  
 Phe Asp Val Val Ala Gln Asn Glu Glu Thr Leu Gln Met Ile Val Ser  
 325 330 335

atg aaa atc atg gaa aat ctt cca caa tcc ggc aga att aat gat cct 1159  
 Met Lys Ile Met Glu Asn Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile Asn Asp Pro  
 340 345 350 355

gaa ggc aat gaa tat atg ttg gct ttg agt aac aga atg caa aaa ata 1207  
 Glu Gly Asn Glu Tyr Met Leu Ala Leu Ser Asn Arg Met Gln Lys Ile  
 360 365 370

ata aac aat gat ttt aat ttc aac gac gta aat ttc cga att ttg ggt 1255  
 Ile Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asn Asp Val Asn Phe Arg Ile Leu Gly  
 375 380 385

gcg aat gta gat gac tta atg aga aac act cgt tgc gga aga tat cac 1303  
 Ala Asn Val Asp Asp Leu Met Arg Asn Thr Arg Cys Gly Arg Tyr His  
 390 395 400

aat cag aat gct ggc aat cag aat gct gac aat cag aat gct gac aat 1351  
 Asn Gln Asn Ala Gly Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn Ala Asp Asn  
 405 410 415

cag aat gct aac aat cag aat gct gat aat cag aat gct aac aaa caa 1399  
 Gln Asn Ala Asn Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn Ala Asn Lys Gln  
 420 425 430 435

aat ggt aat aga caa aat gat aac aga cag aat gat aac aag caa aat 1447  
 Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn  
 440 445 450

ggt aac aga cag aat gat aac aag caa aat ggt aac aga cag aat gat 1495  
 Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp

15/19

455

460

465

aac aag caa aat ggt aac aga caa aat ggt aac aaa cag aat gat aac 1543

Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Gly Asn Lys Gln Asn Asp Asn

470

475

480

aag caa aat ggt aac aga cag aat gat aac aag agg aat ggt aac agg 1591

Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Arg Asn Gly Asn Arg

485

490

495

caa aat gat aat caa aat aat cag aat gat aat aat cga aat gat aat 1639

Gln Asn Asp Asn Gln Asn Asn Gln Asn Asp Asn Asn Arg Asn Asp Asn

500

505

510

515

caa gtt cat cat tct tca aaa tta cat taa atcaatcaat tatcaattaa aat 1692

Gln Val His His Ser Ser Lys Leu His

520

caatttaatta agatgtaaat caaattatit ttttaaataat ttttcgatg taaacaaaat 1752

tttgtaaaat ctttcattat attataaata aataaaataa atatcgttit cgcataaaaa 1812

aaaaaaaaa aaaaaaaaa 1830

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1430

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Apis mellifera

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (46)..(1341)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; sig\_peptide

&lt;222&gt; (46)..(102)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (103)..(1341)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; (1134)

&lt;223&gt; n=a or g or c or t

&lt;400&gt; 8

16/19

ttcacgtaca atattccatt gcttcgttac tgcagctta gaaaa atg aca aga ttg 57

Met Thr Arg Leu

-19

ttt atg ctg gta tgc ctt ggc ata gtt tgt caa ggt acg aca ggc aac 105

Phe Met Leu Val Cys Leu Gly Ile Val Cys Gln Gly Thr Thr Gly Asn

-15

-10

-5

1

att ctt cga gga gag tct tta aac aaa tca tta ccc atc ctt cac gaa 153

Ile Leu Arg Gly Glu Ser Leu Asn Lys Ser Leu Pro Ile Leu His Glu

5

10

15

tgg aaa ttc ttt gat tat gat ttc ggt agc gat gaa aga aga caa gat 201

Trp Lys Phe Phe Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg Arg Gln Asp

20

25

30

gca att cta tct ggc gaa tac gac tac aag aat aat tat cca tcc gac 249

Ala Ile Leu Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Asp

35

40

45

att gac caa tgg cat gat aag att ttt gtc acc atg ctg aga tac aat 297

Ile Asp Gln Trp His Asp Lys Ile Phe Val Thr Met Leu Arg Tyr Asn

50

55

60

65

ggc gta cct tcc tct ttg aac gtg ata tct aaa aag gtc ggt gat ggt 345

Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Ser Lys Lys Val Gly Asp Gly

70

75

80

ggt cct ctt cta caa cct tat ccc gat tgg tgc ttt gct aaa tat gac 393

Gly Pro Leu Leu Gln Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys Tyr Asp

85

90

95

gat tgc tct gga atc gtg agc gcc tca aaa ctt gcg atc gac aaa tgc 441

Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys Leu Ala Ile Asp Lys Cys

100

105

110

gac aga ttg tgg gtt ctg gac tca ggt ctt gtc aat aat act caa ccc 489

Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn Thr Gln Pro

115

120

125

17/19

atg tgt tct cca aaa ctg ctc acc ttt gat ctg act acc tcg caa ttg 537  
Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp Leu Thr Thr Ser Gln Leu  
130 135 140 145

ctc aag caa gtt gaa ata cca cat gat gtt gcc gta aat gcc act aca 585  
Leu Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asp Val Ala Val Asn Ala Thr Thr  
150 155 160

gga aag gga aga tta tca tct cta gct gtt caa tct tta gat tgc aat 633  
Gly Lys Gly Arg Leu Ser Ser Leu Ala Val Gln Ser Leu Asp Cys Asn  
165 170 175

aca aat agc gat act atg gtg tac ata gca gac gag aaa ggt gaa ggt 681  
Thr Asn Ser Asp Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys Gly Glu Gly  
180 185 190

tta atc gtg tat cat aat tct gat gat tcc ttc cat cga ttg act tcc 729  
Leu Ile Val Tyr His Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg Leu Thr Ser  
195 200 205

aac act ttc gat tac gat cct aaa ttt acc aaa atg acg atc gat gga 777  
Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Lys Phe Thr Lys Met Thr Ile Asp Gly  
210 215 220 225

gaa agt tac aca gcc caa gat gga att tct gga atg gct ctt agt ccc 825  
Glu Ser Tyr Thr Ala Gln Asp Gly Ile Ser Gly Met Ala Leu Ser Pro  
230 235 240

atg act aac aat ctc tat tac agt cct gta gct tcc acc agt ttg tat 873  
Met Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Val Ala Ser Thr Ser Leu Tyr  
245 250 255

tat gtt aac acg gaa caa ttc aga aca tcc gat tat caa cag aat gac 921  
Tyr Val Asn Thr Glu Gln Phe Arg Thr Ser Asp Tyr Gln Gln Asn Asp  
260 265 270

ata cat tac gaa gga gtc caa aat att ttg gat acc caa tcg tcc gct 969  
Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn Ile Leu Asp Thr Gln Ser Ser Ala  
275 280 285

18/19

aaa gta gta tca aag agt ggc gtt ctc ttc ttc gga ttg gtg ggc gat 1017  
Lys Val Val Ser Lys Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val Gly Asp  
290 295 300 305

tca gct ctt ggc tgc tgg aac gaa cat cga aca ctt gaa aga cac aat 1065  
Ser Ala Leu Gly Cys Trp Asn Glu His Arg Thr Leu Glu Arg His Asn  
310 315 320

atc cgt acc gtc gct caa agt gat gag act ctt caa atg atc gct agc 1113  
Ile Arg Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr Leu Gln Met Ile Ala Ser  
325 330 335

atg aag att aag gaa gct ctg cca cac gig cct ata ttc gat agg tat 1161  
Met Lys Ile Lys Glu Ala Leu Pro His Val Pro Ile Phe Asp Arg Tyr  
340 345 350

ata aac cgt gaa tac ata ttg gtt tta agt aac aaa atg caa aaa atg 1209  
Ile Asn Arg Glu Tyr Ile Leu Val Leu Ser Asn Lys Met Gln Lys Met  
355 360 365

gtg aat aat gac ttc aac ttc gac gat gtt aac ttc aga att atg aac 1257  
Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg Ile Met Asn  
370 375 380 385

gcg aat gta aac gaa ttg ata ttg aac act cgt tgc gaa aat ccc gat 1305  
Ala Asn Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg Cys Glu Asn Pro Asp  
390 395 400

aat gat cga aca cct ttc aaa att tca atc cat ttg taa aatctgagtt tt 1356  
Asn Asp Arg Thr Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu  
405 410

ttgttatata ttaaataatit ctcgaaatit ctticcatia tgaatgiata aaataaatai 1416  
tgttttcgca taat 1430

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;



19/19

&lt;223&gt; Oligonucleotide as PCR sense primer

&lt;400&gt; 9

cctagaaaaa tgacaaagtg gtg 24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide as PCR anti-sense primer

&lt;400&gt; 10

gattttacaa aattttgttt acatcg 26

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide as PCR sense primer

&lt;400&gt; 11

gctacataatg aacattcttc gaggagag 28

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide as PCR anti-sense primer

&lt;400&gt; 12

gctaggatcc ctattacaaa tggattgaaa ttttg 35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10795

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/17, A61P37/08, A61K7/00, 7/48, 35/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/17, A61P37/08, A61K7/00, 7/48, 35/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JOIS (JST)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Mari KATAOKA et al., "Royal jelly no Ko-Allergy Sayo no Kento", Nat.Med., 20 August, 2001 (20.08.01), Vol.55, No.4, pages 174 to 180, ISSN:1340-3443	1-5,11-13
X	Hideki OKA et al., "Th Saibo Otosei no Chosetsu o Kaishita, Royal jelly no Allergy Han'no Yokusei Sayo", Biotherapy(Tokyo), 29 February, 2000 (29.02.00), Vol.14, No.2; pages 145 to 150, ISSN:0914-2223	1-5,11-13
X	OKA H. et al., 'Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses.', Int.Immunopharmacol., 2001 March; 1(3): 521-32., ISSN:1567-5769	1-5,11-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
05 November, 2003 (05.11.03)Date of mailing of the international search report  
25 November, 2003 (25.11.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10795

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 9-100236 A (Pola Chemical Industries Inc.), 15 April, 1997 (15.04.97), Claim 1; Par. Nos. [0011] to [0013] (Family: none)	1-5,11-13
Y	Schmitzova J. et al., 'A family of major royal jelly proteins of the honeybee <i>Apis mellifera</i> L.' Cellular and Molecular Life Sciences, 1998; 54(9): 1020-1030. ISSN:1420-682X	1-5,11-13
Y	Albert S. et al., 'Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee ( <i>Apis mellifera</i> ) royal jelly.', Insect Biochem.Mol. Biol., 1999 May; 29(5): 427-34., ISSN:0965-1748	1-5,11-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10795

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6 to 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 6 to 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/17, A61P37/08, A61K7/00, 7/48, 35/64

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K38/17, A61P37/08, A61K7/00, 7/48, 35/64

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN) JOIS(JST)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	片岡麻理他, ローヤルゼリーの抗アレルギー作用の検討, Nat Med, 2001.08.20, VOL. 55 NO. 4; PAGE. 174-180, ISSN: 1340-3443	1-5, 11-13
X	岡秀樹他, Th 細胞応答性の調節を介した, ローヤルゼリーのアレルギー反応抑制作用, Biotherapy (Tokyo), 2000.02.29, VOL. 14 NO. 2; PAGE. 145-150, ISSN: 0914-2223	1-5, 11-13
X	Oka H et al. 'Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses.' Int Immunopharmacol.	1-5, 11-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.11.03

国際調査報告の発送日

25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

印

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	2001 Mar;1(3):521-32. ISSN:1567-5769	
X	J P 9-100236 A (ポーラ化成工業株式会社) 1997. 04. 15. 請求項1, 【0011】-【0013】 (ファミリーなし)	1-5, 11-13
Y	Schmitzova J et al. 'A family of major royal jelly proteins of the honeybee <i>Apis mellifera</i> L.' Cellular and Molecular Life Sciences, 1998; 54(9):1020-1030. ISSN:1420-682X	1-5, 11-13
Y	Albert S et al. 'Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee ( <i>Apis mellifera</i> ) royal jelly.' Insect Biochem Mol Biol. 1999 May; 29(5): 427-34. ISSN:0965-1748	1-5, 11-13

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6 - 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 6 - 10 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。